



دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی درمانی قزوین

دانشکده پزشکی

گروه میکروب شناسی و ایمنی شناسی

پایان نامه

جهت دریافت درجه کارشناسی ارشد میکروب شناسی پزشکی

عنوان

فراوانی ژن های bla_{IMP} , bla_{NDM-1} , bla_{AIM} در سویه های بالینی اشريشيا کلي مقاوم به کارباپنم جدا شده از بخش های مراقبت ویژه بیمارستان های قزوین، تهران، کرج

استاد راهنما :

دکتر معصومه اصلانی مهر

اساتید مشاور :

دکتر امیر پیمانی

دکتر آمنه باریکانی

نگارش :

کیوان اسمعیلی فرد برزگر

شماره ثبت: ۸۱

سال فراغت از تحصیل: ۹۵

بِسْمِ اللَّهِ الرَّحْمَنِ الرَّحِيمِ

با سپاس فراوان از همراه همیشگی من در این زندگی، پروردگار بزرگ و مهربانم، و با سپاس از زحمات و تلاش های بی منت خانواده عزیزم، آغاز می کنم.

با سپاس از استاد راهنما و استاد مشاور گرامی: سرکار خانم دکتر معصومه اصلانی مهر، جناب آقای دکتر امیر پیمانی و و دکتر آمنه باریکانی، اساتید گرامی، شما روشنائی بخش تاریکی جان هستی و ظلمت اندیشه را نور می بخشید. چگونه سپاس گویم مهربانی و لطف شما را که سرشار از عشق و یقین است. آری در مقابل این همه عظمت و شکوه شما مرا نه توان سپاس است و نه کلام.

لازم می دانم که در اینجا از زحمات دیگر اساتید بزرگوارم همپون:

❖ آقای دکتر تقی ناصر پور، زنده یاد آقای دکتر حبیب شریفی، خانم دکتر مرجان نصیری اصل، آقای دکتر بابک رحمانی، خانم فاطمه فتوی خزوینی و آقای میر اسماعیل موسوی

9

✓ همکلاسی های مقرر:

❖ خانم ها: زیبا جلیلی، زهرا حاج شفیعی ها، سمر امیر کمالی، گلاره نصیری، هاجر کلهر

❖ آقایان: شاهین بلوری، معین ییلاق بیگی، احسان زارع، پیمان حسینی، سیاوش بفشیان

9

✓ کارکنان دلسوز آزمایشگاه:

❖ خانم ها: دکتر اکرم عظیمی، فاطمه عطاران رضایی، بهرامی، طاهر فانی

❖ آقایان: محسن یولپی فانی، سلیمان منصور قناعتی، ذکریا فلیلی مقدم، فرهاد فباز

و تمامی کسانی که مرا صمیمانه در انجام پایان نامه کمک کردند. تشکر کنم.

۱.....	چکیده فارسی.....
۲.....	فصل اول: مقدمه و کلیات.....
۳.....	۱-۱: بیان مسئله.....
۳.....	۲-۱: عفونت بیمارستانی و بخش مراقبت های ویژه.....
۴.....	۳-۱: انتروباکتریاسه.....
۵.....	۴-۱: تاریخچه.....
۶.....	۵-۱: مشخصات اشریشیا کلی.....
۱۰.....	۶-۱: جایگاه اشریشیا کلی در بدن.....
۱۱.....	۷-۱: نقش اشریشیا کلی در بیماری زایی.....
۱۱.....	۸-۱: فاکتورهای بیماری زایی.....
۱۲.....	۱-۸-۱: ادهزین.....
۱۳.....	۱-۱-۸-۱: آنتی ژن های فاکتور کلونیزاسیون (CFA).....
۱۴.....	۲-۱-۸-۱: فیمبریه تیپ ۱.....
۱۴.....	۳-۱-۸-۱: ادهزین های غیر فیمبریال (AFA).....
۱۵.....	۴-۱-۸-۱: فیمبریه اتصال اگر گیتیو (AAF).....
۱۵.....	۶-۱-۸-۱: پیلی P.....
۱۵.....	۲-۸-۱: تازک.....
۱۶.....	۳-۸-۱: کپسول.....
۱۷.....	۴-۸-۱: لیپو پلی ساکارد (LPS).....
۱۷.....	۵-۸-۱: توکسین.....
۱۷.....	۱-۵-۸-۱: شیگا توکسین (SXT).....

- ۱-۸-۵-۲: توکسین حساس به حرارت (LT)..... ۱۸
- ۱-۸-۵-۳: توکسین مقاوم به حرارت (ST)..... ۱۸
- ۱-۸-۵-۴: همولایزین (HlyA)..... ۱۹
- ۱-۸-۵-۵: سیدروفور..... ۱۹
- ۱-۹-۹: بیماری های های بالینی..... ۱۹
- ۱-۹-۱: بیماری های داخل روده ای..... ۲۰
- ۲-۹-۱: بیماری های خارج روده ای..... ۲۱
- ۳-۹-۱: سایر بیماری ها..... ۲۲
- ۱-۱۰-۱: آنتی بیوتیک..... ۲۲
- ۱-۱۰-۱: بتالاکتام..... ۲۴
- ۱-۱۰-۱-۱: ساختمان شیمیایی بتالاکتام..... ۲۵
- ۱-۱۰-۱-۲: انواع آنتی بیوتیک های بتالاکتام..... ۲۵
- ۱-۱۰-۱-۲-۱: پنی سیلین..... ۲۶
- ۱-۱۰-۱-۲-۲: سفالوسپورین..... ۲۷
- ۱-۱۰-۱-۲-۳: مونوباکتام..... ۲۹
- ۱-۱۰-۱-۲-۴: کارباپنم..... ۳۰
- ۱-۱۰-۲: مکانیسم مقاومت به بتالاکتام..... ۳۳
- ۱-۱۰-۲-۱: سیستم ایفلاکس..... ۳۳
- ۱-۱۰-۲-۲: تغییر در پروتئین متصل شونده به پنی سیلین (PBP)..... ۳۳
- ۱-۱۰-۲-۳: بتالاکتاماز..... ۳۴
- ۱-۱۰-۲-۳-۱: طبقه بندی بتالاکتاماز..... ۳۴
- ۱-۱۰-۲-۳-۲: مهار کننده های بتالاکتامازی..... ۳۹

۳۹.....	۱-۱-۳: متالوبتالاكتاماز.....
۴۴.....	۱-۱: درمان.....
۴۵.....	فصل دوم: بررسی متون.....
۴۶.....	۱-۲: بررسی متون.....
۴۸.....	فصل سوم: مواد و روش ها.....
۴۹.....	۱-۳: اهداف و فرضیات.....
۴۹.....	۳-۱-۱: هدف اصلی.....
۴۹.....	۳-۱-۲: اهداف فرعی.....
۴۹.....	۳-۱-۳: اهداف کاربردی.....
۵۰.....	۳-۱-۴: فرضیات یا سوال های پژوهش.....
۵۰.....	۳-۲: مواد و روش ها.....
۵۰.....	۳-۲-۱: نوع مطالعه.....
۵۱.....	۳-۲-۲: جامعه مورد مطالعه و روش نمونه گیری.....
۵۲.....	۳-۳: جمع آوری نمونه.....
۵۲.....	۳-۴: آزمایش تعیین هویت ایزوله ها به روش فنوتیپی.....
۵۵.....	۳-۵: تعیین الگوی حساسیت آنتی بیوتیکی.....
۵۷.....	۳-۶: تعیین حداقل غلظت مهارى آنتى بیوتیک (MIC).....
۵۹.....	۳-۷: روش هوچ تست اصلاح شده (MHT).....
۶۰.....	۳-۸: روش دیسک ترکیبی.....
۶۲.....	۳-۹: روش واکنش زنجیره ای پلی مرارز (PCR).....
۶۴.....	۳-۱۰: روش تجزیه و تحلیل داده ها.....

فصل چهارم: نتایج.....	۶۵
۴-۱: یافته های زمینه ای.....	۶۶
۴-۲: نتایج آنتی بیوگرام.....	۶۷
۴-۳: نتایج حداقل غلظت مهاري آنتی بیوتیک (MIC).....	۶۸
۴-۴: نتایج روش هوچ تست اصلاح شده (MHT).....	۶۹
۴-۵: نتایج دیسک ترکیبی.....	۶۹
۴-۶: نتایج واکنش زنجیره ای پلی مرارز (PCR).....	۷۰
فصل پنجم: بحث و نتیجه گیری.....	۷۱
۵-۱: بحث.....	۷۲
۵-۲: نتیجه گیری.....	۷۵
۵-۳: پیشنهادات.....	۷۵
فصل ششم: منابع.....	۷۶
ضمائم.....	۹۱
فهرست جداول.....	
جدول ۱-۱: طبقه بندی علمی اشريشيا کلي.....	۷
جدول ۱-۲: طبقه بندی خانواده بتالاكتاماز.....	۳۸
جدول ۱-۳: متغيرهای این مطالعه.....	۵۲
جدول ۲-۳: طيف مقادير آنتی بیوگرام برای دیسک های این مطالعه.....	۵۶
جدول ۳-۳: پرايمرهای به کار رفته در این مطالعه.....	۶۳
جدول ۳-۴: مقادير ترکیبات به کار رفته برای انجام PCR برای هر نمونه.....	۶۳
جدول ۳-۵: شرایط ایده آل دمایی و زمانی فرآیند PCR برای پرايمرهای این مطالعه.....	۶۳

جدول ۱-۴: تعداد ایزوله ها به تفکیک بیمارستان های شهر قزوین.....	۶۶
جدول ۲-۴: فراوانی ایزوله های اشرشیاکلی جمع آوری شده از بخش مراقبت ویژه به تفکیک جنسیت.....	۶۶
جدول ۳-۴: نتایج MIC برای ایزوله های اشرشیاکلی جدا شده از بیماران.....	۶۸
فهرست اشکال.....	
شکل ۱-۲: ساختمان شیمیایی آنتی بیوتیک های خانواده بتالاکتام.....	۲۶
شکل ۱-۳: ساختمان شیمیایی آنتی بیوتیک های گروه کارباپنم.....	۳۱
شکل ۱-۳: مجموعه تست های گالری برای تشخیص و تمایز اعضای انتروباکتریاسه.....	۵۴
شکل ۲-۳: کلنی های <i>E. coli</i> بر روی محیط نوترینت अगर.....	۵۵
شکل ۳-۳: روش آنتی بیوگرام برای نمونه های مورد مطالعه.....	۵۶
شکل ۳-۴: پودر ایمی پنم به کار رفته برای MIC.....	۵۷
شکل ۳-۵: نمایی کلی از غلظت های مختلف ایمی پنم در روش MIC.....	۵۹
شکل ۳-۶: روش MHT با استفاده از دیسک مروپنم.....	۶۰
شکل ۳-۷: روش دیسک ترکیبی.....	۶۲
شکل ۱-۴: روش هوج تست اصلاح شده (MHT) برای شناسایی ایزوله های مولد کارباپنماز.....	۷۰
شکل ۲-۴: روش دیسک ترکیبی برای شناسایی ایزوله های مولد متالوبتالاکتاماز.....	۷۰
شکل ۳-۴: نتایج روش PCR برای شناسایی ژن های مورد مطالعه.....	۷۱
فهرست نمودارها.....	
نمودار ۱-۴: توزیع فراوانی نسبی ایزوله های جمع آوری شده بر اساس نمونه.....	۶۸
نمودار ۲-۴: نتایج آنتی بیوگرام برای نمونه های مورد مطالعه.....	۶۸
چکیده انگلیسی.....	۹۳

چکیده فارسی:

زمینه و هدف: عفونت ها از مهمترین علل مرگ و میر در بخش مراقبت های ویژه (ICU) به ویژه در کودکان می باشد. شیوع اشریشیا کلی های مولد کارباپنماز از مشکلات مهم در ICU می باشد، که منجر به محدود شدن راه های کنترل عفونت و گزینه های درمانی مناسب شده است

هدف از این بررسی تعیین فراوانی ژن های bla_{IMP} , bla_{NDM-1} , bla_{AIM} در سویه های بالینی اشریشیا کلی مقاوم به کارباپنم جدا شده از بخش مراقبت های ویژه بیمارستان های آموزشی قزوین، تهران، کرج بود.

روش مطالعه: ۲۶۷ ایزوله یوروپاتوژن اشریشیا کلی از بیماران بستری در بخش مراقبت های ویژه بیمارستان های قزوین، کرج و تهران جمع آوری گردید. ایزوله ها با روش فنوتیپی در ابتدا از نظر وجود اشریشیا کلی تأیید و سپس از نظر حضور کارباپنماز غربالگری شدند و با روش دیسک ترکیبی بروی محیط مولر هینتون آگار با استفاده از دیسک ایمپی پنم و ایمپی پنم حاوی اتیلن دی آمین تترا استیک اسید (EDTA) از نظر وجود متالوبتالاکتاماز مورد بررسی قرار گرفتند و با استفاده از آزمون PCR و تعیین توالی فراوانی ژن های bla_{IMP} , bla_{NDM-1} , bla_{AIM} مورد بررسی قرار گرفت.

نتایج: از ۲۶۷ ایزوله در ICU ۱۱۱ ایزوله (۴۱/۵٪) به ایمپی پنم، ۵۱ ایزوله (۱۹/۱٪) به ارتاپنم، ۳۵ ایزوله (۱۳/۱٪) به مروپنم مقاوم بودند. همچنین از ۱۳۱ ایزوله غیر حساس به هریک از کارباپنم ها، ۷۰ ایزوله (۵۳/۴۳٪) حاوی کارباپنماز بودند که با روش MHT شناسایی شدند. همچنین از ۱۳۱ ایزوله غیر حساس، در آزمایش دیسک ترکیبی، ۴۸ ایزوله (۳۶/۶۴٪) حاوی متالوبتالاکتاماز بودند و هنگامی که با استفاده از روش PCR مورد آزمایش قرار گرفتند. هیچ یک از ایزوله ها حاوی سه ژن bla_{IMP} , bla_{AIM} , bla_{NDM} نبودند.

واژگان کلیدی: اشریشیا کلی، بخش مراقبت ویژه (ICU)، کارباپنماز

فصل اول

مقدمه و کلیات

۱-۱ بیان مسئله:

۱-۲ عفونت بیمارستانی (HAI)^۱ و بخش مراقبت های ویژه (ICU)^۲

عفونت بیمارستانی، عفونتی است که در بیماران بستری در بیمارستان یا سایر مراکز ارائه دهنده خدمات درمانی ایجاد می شود، به شرطی که بیمار در بدو بستری این عفونت را با خود همراه نداشته و علاوه بر آن، فرد در دوره نهفته بیماری نیز نباشد (۱). عفونت بیمارستانی، معمولاً از ۴۸ ساعت بستری در بیمارستانی، ۳ روز بعد از ترخیص یا ۳۰ روز بعد از عمل جراحی در بیماران به وجود می آید و تخمین زده شده که به ازای هر ۱۰ نفر بیمار بستری در بیمارستان، ۱ نفر به این نوع عفونت مبتلا می شود (۲) این نوع از عفونت که در سرتاسر دنیا، (در کشور های توسعه یافته و همچنین در کشورهای در حال توسعه) روی می دهد، به دلیل ناتوانی عملکردی و فشار روحی در بیمار، باعث کاهش کیفیت زندگی فرد می شود. فراوان ترین عفونت های بیمارستانی، عفونت های زخم های ناشی از جراحی، عفونت های ادراری و عفونت های مسیر تنفسی تحتانی است. عفونت های بیمارستانی که یکی از مشکلات مهم و اساسی در مراکز بیمارستانی می باشد، علاوه بر افزایش مرگ و میر، باعث افزایش طول مدت بستری در بیمارستان و افزایش هزینه های درمانی می شود. براساس مطالعات سازمان جهانی بهداشت (WHO)^۳ در سال های اخیر، بالاترین شیوع عفونت های بیمارستانی در بخش مراقبت های ویژه (ICU) بوده است. میزان عفونت بیمارستانی در بخش مراقبت های ویژه، در مقایسه با بخش های دیگر بیمارستان، بالا است و شیوع آن در بزرگسالان و کودکان بستری در ICU تقریباً ۳ برابر بیشتر از سایر بخش های بیمارستان می باشد (۳-۹). بیش از ۶۰٪ عفونت های بیمارستانی را عفونت مجرای ادراری (معمولاً به دنبال استفاده از کاتتر^۴)، عفونت مجرای ادراری یکی از مهمترین عوامل تهدید کننده حیات در بیماران بستری در بیمارستان است بیماران بستری در ICU در معرض خطر بیشتری برای ابتلای به عفونت های بیمارستانی می باشند، به طوریکه تقریباً ۲۵٪ عفونت های بیمارستانی و ۹۰٪ طغیان ها در بخش های مراقبت ویژه بیمارستان ها رخ می دهد (۸). بنابراین بخش مراقبت های ویژه از قسمت های مهم بیمارستان می باشد و بیمارانی که در این بخش ها بستری می شوند دامنه وسیعی از اختلالات عملکردی و یا نقص

World Health Organization ^۳
Catheter ^۴

Hospital-Acquired Infection ^۱
Intensive Care Unit ^۲

در یک یا چند ارگان به ویژه سیستم های تنفسی و قلبی و عروقی دارند. از آنجایی که استفاده از کاتتر های وریدی و ادراری و دستگاه های کمک تنفسی به طور وسیع به کار گرفته می شود، خطر ابتلا به عفونت ها افزایش می یابد (۶، ۸).

از طرفی دیگر، مصرف بی رویه عوامل ضد میکروبی به کلونیزه شدن میکروارگانیسم های مقاوم منجر می شود. باسیل های گرم منفی با مقاومت چندگانه^۵ از پاتوژن های مهم بخش ICU هستند که سبب نرخ بالای مرگ و میر در بیماران بستری در این بخش ها می شود. در این میان، اشریشیا کلی^۶ که به عنوان یکی از اعضای خانواده انتروباکتریاسه^۷ می باشد، از عوامل مهم ایجاد کننده عفونت بیمارستانی در ICU به شمار می رود. این ارگانیسم شایعترین علت ایجاد عفونت های مجاری ادراری و همچنین یک پاتوژن مهم مننژیت نوزادان و عفونت های تنفسی و سپسیس در بیماران بستری در بخش های مختلف بیمارستان به ویژه بخش ICU می باشد. مقاومت آنتی بیوتیکی در بین سویه های اشریشیا کلی به دلیل کسب فاکتورهای متعدد مقاومتی بسیار شایع است (۱۰-۱۳).

۳-۱: انتروباکتریاسه

این خانواده بزرگترین و ناهمگون ترین مجموعه باسیل های گرم منفی است. اعضای این گروه که همگی کموارگانوتروف^۸ هستند، از لحاظ نیاز به اکسیژن در گروه بی هوازی های اختیاری قرار می گیرند و می توانند هم در حضور اکسیژن و هم در نبود آن رشد کنند، از دیگر ویژگی های اعضای این خانواده: توانایی رشد در طیف دمایی ۲۲ تا ۳۵ درجه سانتی گراد، عدم تولید اسپور یا کیست، همگی به استثناء زنورابدوس^۹ و شیگلا دیسانتری سروگروه O₁^{۱۰}، کاتالاز مثبت هستند. در کل ۴۴ جنس و ۱۷۶ گونه باکتریایی در این خانواده قرار دارند.

طبقه بندی کامل جنس و گونه و حتی زیر گونه های شناسایی شده است (۱۴-۱۶). اعضای انتروباکتریاسه، در محیط های کشت غیر انتخابی مثل شکلات آگار، بلاد آگار گوسفندی، کلنی های بزرگ، مرطوب و خاکستری ایجاد می

Chemoorganotroph^۸
Xenorhabdus^۹
Shigella dysenteriae serogroup O₁^{۱۰}

Multi Drug Resistant^۵
Escherichia coli (*E. coli*)^۶
Enterobacteriaceae^۷

کنند) به استثناء کلبسیلا که کلنی های بسیار موکوئیدی و بزرگی دارد). قرار دادن اعضای انتروباکتریاسه در این خانواده اولین بار توسط اوینگ^{۱۱} در سال ۱۹۶۳ انجام شد. اعضای این خانواده در طبیعت (آب، خاک، فاضلاب) به طور فراوان حضور دارند، علاوه بر این، آنها به عنوان فلور نرمال در مجاری گوارشی شناخته می شوند (۱۷). بعضی از اعضای این خانواده همانند باکتری هایی که در ناحیه گوارشی کومنسال قرار دارند، بدون ایجاد علائم بیماری در انسان مستقر می شوند، با این حال اعضای این گروه می توانند مولد بیماری های عفونی در نواحی مختلف بدن مانند خون، مایع مغزی-نخاعی، ناحیه تنفسی، دستگاه گوارشی، دستگاه ادراری، بافت های نرم و حتی مایعات استریل بدن باشند، همچنین تعدادی از اعضای این خانواده (مانند سالمونلا^{۱۲}، شیگلا^{۱۳}، یرسینیا^{۱۴}) بطور معمول بیماری زا هستند و بقیه اعضاء در صورتی که از محل زندگی طبیعی خود خارج شوند، بیماری زا تلقی می شوند، در اصل این گروه از باکتری ها مولد عفونت های فرصت طلب هستند (۱۷، ۱۸).

۴-۱: تاریخچه

اشریشیا کلی، اولین بار در سال ۱۸۸۵ توسط یک پزشک آلمانی به نام تئودور اشیریش^{۱۵} که بر روی فلور نرمال روده اطفال مطالعه می کرد، شناسایی شد. اشیریشیا کلی، ارگانیسمی است که مطالعات گسترده ای روی آن انجام شده است، برای مثال تاتوم و لیدربرگ برای اولین بار در سال ۱۹۴۶ با مطالعه بر روی اشیریشیا کلی نوعی نو ترکیبی^{۱۶} به نام کونژوگاسیون^{۱۷} را کشف کردند. از طرفی دیگر، مطالعات مونود بر روی سیستم تخمیر لاکتوز در اشیریشیا کلی فهم ما را در رابطه با کنترل مکانیسم های فعالیت بیوشیمیایی سلولی در همه موجودات زنده پایه گذاری کرد (۱۹).

Theodor Escherich^{۱۵}
Recombination^{۱۶}
Conjugation^{۱۷}

Ewing^{۱۱}
Salmonella^{۱۲}
Shigella^{۱۳}
Yersinia^{۱۴}

۱-۵: مشخصات اشیریشیا کلی

اشیریشیا کلی که جزء یکی از پنج جنس مهم دیگر اشیریشیا مانند اشیریشیا آلبرتی^{۱۸}، اشیریشیا هرمانی^{۱۹}، اشیریشیا وولنریس^{۲۰} و اشیریشیا فرگوسونی^{۲۱} است، یکی از شایع ترین باسیل های گرم منفی جدا شده از موارد بالینی و عامل بیش از ۸۰ درصد عفونت های دستگاه ادراری اکتسابی از جامعه و همچنین عفونت های اکتسابی از بیمارستان است، اشیریشیا کلی یکی از اعضای خانواده انتروباکتریاسه بوده، و به عنوان میکروارگانیزم فلور نرمال روده انسان نیز مطرح است (۲۰، ۲۱). اشیریشیا کلی، باکتری گرم منفی، بی هوازی اختیاری (در حضور اکسیژن، تنفس هوازی انجام می دهد که منجر به تولید ATP می شود و در نبود اکسیژن، تنفس بی هوازی، یا تخمیر انجام می دهد) و بدون اسپور است، که به دلیل داشتن تاژک از نوع پری تریش، متحرک نیز است. باکتری تقریباً ۲ میکرومتر^{۲۲} طول و ۰/۲۵ تا ۱ میکرومتر قطر و ۰/۶ تا ۰/۷ میکرومتر مکعب^{۲۳} حجم دارد (۲۲-۲۴). باکتری به دلیل دارا بودن دو سیستم اکسیداسیون- احیاء: مناکوئینون^{۲۴} و یوبی کوئینون^{۲۵} قادر است تا انرژی مورد نیاز خود را از متابولیسم در هر دو شرایط هوازی و بی هوازی بدست آورد. اشیریشیا کلی دارای یک مولکول دزوکسی ریبونوکلیک اسید تک رشته ای حلقوی بسته یک میلی متری با ژنومی حاوی ۴۶۴۰ کیلو جفت باز است (۱۴، ۱۵). رشد بهینه باکتری در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد (۹۸/۶ درجه فارنهایت) است. اکثر سویه های این باکتری، توانایی تخمیر لاکتوز را دارند که در محیط مک کانکی آگار^{۲۶} به صورت کلنی های قرمز دیده می شود. به استثناء سویه اشیریشیا کلی انتروهموراژیک سروتپ O₁₅₇:H₇^{۲۷} بقیه سویه ها توانایی تخمیر سوربیتول در محیط سوربیتول مک کانکی آگار^{۲۸} را دارند. این باکتری فاقد آنزیم اوره آز و فنیل آلانین دامیناز است، توانایی استفاده از سیتрат (در محیط سیمون سیترات آگار) و تولید هیدروژن سولفید را ندارد، در محیط پتاسیم سیانید رشد نمی کند. نتیجه آزمون متیل رد^{۲۹} در این باکتری مثبت است، از طرفی دیگر، آزمون ووگس-پروسکر^{۳۰} در این باکتری منفی است. اشیریشیا کلی توانایی هیدرولیز تریپتوفان (به دلیل وجود تریپتوفاناز) را دارد که از آن به نام اندول مثبت یاد می شود. آنها آنزیم ۴-متیل اومبلی

Menaquinon^{۲۴}
Ubiquinon^{۲۵}
Mac conky agar^{۲۶}
Enterohemorrhagic *E. coli* serotype O₁₅₇:H₇^{۲۷}
Sorbitol Mac conky Agar^{۲۸}
Methyl red^{۲۹}
Voges-Prausker^{۳۰}

E.albertii^{۱۸}
E.hermannii^{۱۹}
E.vulneris^{۲۰}
E.fergusonii^{۲۱}
μm^{۲۲}
μm^۳^{۲۳}

فریل بتا-دی گلوکورونیداز^{۳۱} را دارند) به استثناء سویه اشیشیا کلی انتروهموراژیک سروتیپ O₁₅₇:H₇ و سویه های تولید کننده وروتوکسین). اشیشیا کلی در محیط بلاد آگار گوسفندی و شکلات آگار توانایی همولیز بتا را دارد (۱۴، ۱۷). اشیشیا کلی چندین ویژگی منحصر به فرد دیگر نیز دارد، این ویژگی ها شامل: توانایی رشد در شرایط هوازی و بی هوازی، توالی ژنوم قابل دسترس، سهولت در کشت، که همه این عوامل باعث شده است تا اشیشیا کلی یک ارگانیسم مهم در صنعت بیوتکنولوژی و شایع ترین میکروارگانیسم در تکنولوژی ساخت DNA نو ترکیب مطرح باشد. به علت اهمیت بالای اشیشیا کلی در مدفوع انسان نسبت به دیگر ارگانیسم ها، به طور معمول به عنوان نشانگر در صنعت تصفیه آب به کار می رود (۱۷، ۲۵).

جدول ۱-۱: طبقه بندی علمی اشیشیا کلی (۱۶)

بakteri	قلمرو ^{۳۲}
یوباکتیریا ^{۳۴}	سلسله ^{۳۳}
پروتئوباکتیریا ^{۳۶}	شاخه ^{۳۵}
گاما پروتئوباکتیریا ^{۳۸}	رده ^{۳۷}
انتروباکتریال ^{۴۰}	راسته ^{۳۹}
انتروباکتریاسه	خانواده ^{۴۱}
اشیشیا	جنس ^{۴۲}
کلی	گونه ^{۴۳}

Class^{۳۷}
Gamaproteobacteria^{۳۸}
Order^{۳۹}
Enterobacteriales^{۴۰}
Family^{۴۱}
Genus^{۴۲}
Species^{۴۳}

4-methylumbelipheryl β di^{۳۱}
glucoronidase
Domain^{۳۲}
Kingdom^{۳۳}
Eubacteria^{۳۴}
Phylum^{۳۵}
Proteobacteria^{۳۶}

جمعیت اشريشيا کلي درجه بالايي از تنوع فنوتيپي و ژنوتيپي را نشان مي دهد. طبقه بندي انتروباکترياسه پيچيده است، يکي از راه هاي طبقه بندي اشريشيا کلاي، تعيين درصد سيتوزين-گوانين است که از آن مي توان در تمايز اشريشيا کلي با ديگر اعضا انتروباکترياسه استفاده کرد، براي مثال درصد C+G در اشريشيا کلي ۴۸-۵۲٪ است. يکي ديگر از روش هاي طبقه بندي، آناليز توالي srDNA ۱۶ است. براي مثال در تولوموناس اونسيس^{۴۴}، ۱۰٪ توالي هاي srDNA ۱۶ اين باکتری از نزديک ترين باکتری ها مثل اشريشيا، سراشيا، انتروباکتر جدا شده است. يکي ديگر از روش هاي طبقه بندي، هيبريديزاسيون DNA-DNA^{۴۵} است. براي مثال در مطالعه اي، اشريشيا کلي با سويه شماره K-12MG1655 و پروب CFT 73، نتيجه هيبريديزاسيون DNA-DNA $1/5 \pm 95/7$ ٪ شد اين در حالي است که در همان سويه با شماره پروب E۲۳۴۸/۶۹، نتيجه هيبريديزاسيون DNA-DNA ۴/۱ $\pm 75/5$ ٪ شد (14, 16, 26).

جمعیت اشريشيا کلي چه به صورت کومنسال و چه به صورت پاتوژن به طور معمول به چهار گروه فيلوژني اصلي تقسيم مي شود: A, B₁, B₂, D. براي مثال در يک بررسي با هدف آناليز فيلوژني سويه هاي اشريشيا کلي که در سال ۲۰۰۷ تا ۲۰۱۱ در هانگژو برروي ۲۲ ايزوله کلينيکي اشريشيا کلي مقاوم يا کاهش حساسيت به کارباپنم انجام شد، مشخص شد که ۹ گروه فيلوژني B₂ متعلق به اشريشيا کلي تيپ سکانس ۱۳۱ و از ۱۱ گروه فيلوژني D، ۵ ايزوله متعلق به اشريشيا کلي تيپ سکانس ۶۴۸ و فقط يک ايزوله شناسايي شده از گروه فيلوژني B₁ به نام اشريشيا کلي تيپ سکانس ۲۱۷۹ و يک ايزوله شناسايي شده از گروه فيلوژني A به نام اشريشيا کلي تيپ سکانس ۷۴۴ بود (۲۷، ۲۸). برمبنای فاکتور هاي ويرو لانس و علائم بيماري، گونه هاي اشريشيا کلي به ۶ گروه اصلي (تيپ هاي پاتوژنيک يا پاتوتايب) که همگي از پاتوژن هاي داخل روده اي هستند طبقه بندي مي شود (۲۹، ۳۰). اين ۶ گروه اصلي شامل: اشريشياکلي انتروپاتوژنيک (EPEC)^{۴۶}، اشريشيا کلي مولد توکسين شيگا (STEC)^{۴۷}، اشريشيا کلي انترواگرگتيو (EAEC)^{۴۸}، اشريشياکلي انتروتوکسيژنيک (ETEC)^{۴۹}، اشريشياکلي انترواينوزيو (EIEC)^{۵۰} و

^{۴۸} Enteropathogenic *E. coli*
^{۴۹} Enterotoxigenic *E. coli*
^{۵۰} Enteroinvasive *E. coli*

^{۴۴} *Tolomonas auensis*
^{۴۵} DNA-DNA Hybridization
^{۴۶} Enteropathogenic *E. coli*
^{۴۷} Shiga- toxin like *E. coli*

اشریشیاکلی مولد ادهزین منتشره (DAEC)^{۵۱} می باشد (۳۰)، از طرفی دیگر، ۳ گروه اشریشیاکلی خارج روده ای نیز وجود دارد که شامل: اشریشیا کلی مولد مننژیت نوزادی (NMEC)^{۵۲}، اشریشیا کلی مولد سپسیس (SEPEC)^{۵۳} و اشریشیا کلی یوروپاتوژنیک (UPEC)^{۵۴} می باشند (۳۱). در سروتیپ بندی، گونه یک باکتری را با آزمون های سرولوژیک به زیر گونه های متعددی طبقه بندی می کنند که بیشتر برای اهداف اپیدمیولوژی به کار می رود. یک سیستم معمول طبقه بندی *E. coli* بر اساس تفاوت سروتایپینگ آنتی ژن های H, O, K با روش سرولوژیک تقسیم بندی می شوند. سروتیپ بندی سویه های اشریشیا کلی براساس آنتی ژن های O (سوماتیک)، H (فلاژل)، K (کپسولی) انجام می گیرد. بطور مثال *E. coli* O₁₅₇:H₇ که یکی از سروتیپ های مهم اشریشیا کلی انتروهموراژیک است، آنتی ژن O، که مقاوم به حرارت است، قسمتی از لیپو پلی ساکارید^{۵۵} است، در واقع، قسمت های قندی تکراری (از ۱ تا ۴۰ واحد تکراری) و ایمونولوژیک است که در سطح LPS قرار می گیرد و براساس آن، تعداد سروتیپ های آنتی ژن O، از O₁ تا O₁₈₁ می باشد آنتی ژن K همان کپسول است که باکتری را در برگرفته است و حساس به حرارت است. آنتی ژن H همان فلاژل باکتری است که از جنس پروتئین و حساس به حرارت است و براساس آن، تعداد سروتیپ های آنتی ژن از H₁ تا H₅₆ است. آنتی ژن های O₁، O₂، O₄، O₆، O₇، O₈، O₁₆، O₁₈، O₂₅ و O₇₅ در میان سویه های اشریشیا کلی یوروپاتوژنیک فراوانی بالایی دارد این در حالی است که آنتی ژن های H و K کمتر دیده شده اند (۳۲، ۳۳). بعضی از این سروتیپ ها، مخصوص بعضی از تیپ های بیماری زا (پاتوتایپ) هستند. به عنوان مثال، اشریشیا کلی سروتیپ K₁ که با پلی ساکارید کپسولی B نیسریا مننژایتیدیس^{۵۶} واکنش متقاطع می دهد، تقریباً در ۷۵٪ از موارد مننژیت جدا شده است. برای مثال، سروتایپ *E. coli* O₁₅₇:H₇ در واقع نوعی EHEC است که با تولید توکسین شیکا موجب اسهال خونی می شود. سویه های مختلف *E. coli*، اغلب اختصاصیت میزبانی دارند که باعث می شود تا بتوانیم منشأ آلودگی مدفوعی را در نمونه های محیطی مشخص کنیم. برخی از سویه ها ویژگی هایی را دارند که می توانند برای میزبان بسیار مضر باشند. این سویه های مضر بطور شایع باعث شروع ناگهانی اسهال می شوند. یک سویه از *E. coli*، یک زیر گروه در میان گونه هایی است که ویژگی

Uropathogenic E. coli ^{۵۴}
Lipopolysaccharide (LPS) ^{۵۵}
Neisseria meningitidis ^{۵۶}

Diffuse-adhering E. coli ^{۵۱}
Neonatal meningitides E. coli ^{۵۲}
Sepsis-associated E. coli ^{۵۳}

منحصر به فردی دارد که آنها را از سویه های دیگر *E. coli* جدا می کند. این تفاوت ها اغلب تنها در سطح مولکولی قابل تشخیص هستند، با این وجود این تفاوت ها می تواند در فیزیولوژی باکتری و یا روش زندگی آن تغییر کند (۱۴، ۱۵، ۱۸، ۱۹، ۳۴-۳۶).

۱-۶: جایگاه اشریشیا کلی در بدن

اکثر سطوح اپیتلیال بدن ما، مانند پوست، موکوس، توسط تعداد زیادی میکروارگانیسم، که به نام میکروفلور نرمال یا میکروبیوتا^{۵۷} می باشد، کلونیزه می شود. میکروبیوتا بیشتر مربوط به باکتری ها است، هرچند ویروس^{۵۸} ها، قارچ^{۵۹} ها و تک یاخته^{۶۰} ها هم حضور دارند. اکثر باکتری ها میکروبیوتا (کومنسال^{۶۱}) همزیستی دارند. این باکتری ها در محل هایی از بدن که وضعیت رشد و تکثیر مساعد است، قرار دارند (۳۷). در اشریشیا کلی، فلور نرمال قسمت تحتانی مجاری گوارشی انسان و حیوانات خون گرم است. این باکتری در کناره چشمه های آب گرم نیز وجود دارد (۱۷، ۳۰، ۳۸). اشریشیا کلی یکی از اولین باکتری هایی است که در روده نوزادان کلونیزه می شود و تا پایان عمر در فرد می ماند. با این که، شایع ترین عامل عفونت های داخل شکمی در انسان می باشد، اما در حدود ۱٪ از کل جمعیت فلور نرمال روده بزرگ را تشکیل می دهد (۱۵، ۳۰)، محل استقرار اشریشیا کلی کومنسال لایه مخاطی کولون پستانداران می باشد. یک مطالعه در سال ۱۹۹۶ پیشنهاد می کند که اشریشیا کلی ممکن است توانایی استفاده از گلوکونات را در کولون با بازده بالاتری نسبت به سایر باکتری ها داشته باشد و به خاطر همین، باکتری می تواند محل استقرار خود را بطور اختصاصی اشغال کند، احتمالاً به همین دلیل، فلور نرمال غالب این ناحیه، اشریشیا کلی است (۱۴، ۱۵). وجود *E. coli* در بدن به عنوان فلور کومنسال چندین فایده برای میزبان دارد که شامل: نقش کلیدی در توسعه و تنظیم سیستم ایمنی، حفاظت میزبان در برابر پاتوژن های خارجی، فراهم کردن ویتامین هایی مثل K، B12 برای میزبان (۳۹)، همچنین سویه های کومنسال اشریشیا کلی در روده نقش مهمی در پایداری فلور میکروبی لومینال و هموستازی^{۶۲} روده ای دارد.

Protozoa^{۶۰}
Commensal^{۶۱}
Haemostasis^{۶۲}

Microbiota^{۵۷}
Virus^{۵۸}
Fungi^{۵۹}

۷-۱: نقش اشریشیا کلی در بیماری زایی

سویه های بیماری زای اشریشیا کلی مسئول ایجاد ۳ نوع عفونت در انسان هستند:

عفونت مجرای ادراری، مننژیت نوزادی، گاستروانتریت اشریشیا کلی عامل ۷۰-۹۰٪ سیستمیت^{۶۳} های بدخیم غیر پیچیده اکتسابی از جامعه و عامل ۷۵-۹۰٪ از دیگر موارد عفونت است (۳۰، ۴۰-۴۲). در این میان، اشریشیا کلای یوروپاتوژنیک در حدود ۹۰٪ عفونت های مجاری ادراری اکتسابی از جامعه و بیش از ۵۰٪ عفونت های مجاری ادراری بیمارستانی را به خود اختصاص داده است (۴۳). گرچه باکتری به عنوان عامل عفونت مجاری ادراری مطرح است، ولی توانایی ایجاد مننژیت و اسهال را هم دارد (۴۴). اشریشیا کلی یکی از شایع ترین عوامل ایجاد مننژیت نوزادی است، بطور تقریبی ۷۵٪ از سویه های *E. coli*، که از موارد مننژیت جدا می شوند آنتی ژن K₁ را دارند (۱۴).

۸-۱: فاکتورهای بیماری زایی

بیماری های ایجاد شده توسط سویه های *E. coli* مربوط به توزیع و بیان عوامل ویروالانسی نظیر ادهزین هایی مانند آنتی ژن های فاکتور کلونیزاسیون، فیمبریه تیپ ۱، فیمبریه P، فیمبریه S، اینتیمین^{۶۴}، فاکتور اتصال *EPEC*، توکسین هایی مانند توکسین حساس به حرارت^{۶۵}، توکسین مقاوم به حرارت^{۶۶}، توکسین شیگا^{۶۷}، سایتوتوکسین^{۶۸}، اندوتوکسین، توانایی بقاء در برابر دفاع ایمنی مثل کپسول، آنتی ژن K، لیپوپلی ساکارید، تنوع آنتی ژنیک، قدرت تهاجم به وسیله همولایزین^{۶۹} است. حضور دو یا چندین زیر مجموعه از ژن های ویروالانس شامل:

papA، *papC*، *sfa/draBC*، *iutA*، *kpsMTII* نشان دهنده اشریشیا کلی مولد عفونت خارج روده ای (ExPEC)^{۷۰} است. همچنین گونه هایی که از لحاظ فیلوژنتیکی جزء گروه های B2، یا D هستند معمولاً مسئول ایجاد عفونت مجرای ادراری بدخیم هستند (۴۵).

Shiga toxin^{۶۷}
Cytotoxin^{۶۸}
Haemolysin^{۶۹}
Exogenous Pathogenic *E. coli*^{۷۰}

Cystis^{۶۳}
Intimin^{۶۴}
Liable-heat Toxin^{۶۵}
Stable-heat Toxin^{۶۶}

با اینکه هیچ شواهد محکمی برای نقش آنتی ژن های K در پاتوژنیسیته *UPEC* گزارش نشده است. اما دیده شده است که ایزوله های *UPEC* که آنتی ژن های K₁ یا O₁₈ را کد می کنند چندین فاکتور مرتبط با ویرولانسی، بیش تر از دیگر ایزوله های اشريشيا کلي مولد عفونت خارج روده ای ایجاد می کنند(۴۶).

۱-۸-۱: ادھزین^{۷۱}

از آنجایی که برای ایجاد واکنش بین باکتری و سلول های اپیتلیال، اتصال به سلول های اپیتلیال در طی فرایند کلونیزاسیون مهم است، چندین فاکتور از جمله ادھزین های مختلف براساس مرحله عفونت نقش مهمی ایفا می کنند. برای مثال ادھزین ها در پاتوژنیسیته اشريشيا کلي یوروپاتوژنیک نقش تعیین کننده ای را ایفا می کنند چرا که به باکتری اجازه می دهد تا در مقابل جریان ادرار که به عنوان یکی از چندین پاسخ ایمنی ذاتی است، مقاومت کند و این به نوبه خود باعث افزایش تهاجم *UPEC* می شود(۴۷)، همچنین اتصال، باعث القای ورود *UPEC* به درون سلول های اپی تلیال میزبان می شود که در واقع خود یک فرایندی است که بواسطه آن *UPEC* در مجرای ادراری زنده می ماند(۴۸). فاکتورهای اتصال اولیه که در *UPEC* و بسیاری از دیگر میکروب ها کد می شود، بصورت مونومر، الیگومرهای ساده یا اعضای فیبر های سوپر مولکول یا ارگانل های چسبنده رشته ای به نام پیلی^{۷۲} یا فیمبریه^{۷۳} هستند. این ارگانل ها که بطور کلی، فقط بوسیله میکروسکوپ الکترونی دیده می شوند و کوتاه تر و باریک تر از فلاژل ها هستند در *UPEC شامل: پیلی تیپ ۱، P، S، F₁C، می باشند که به ترتیب توسط اوپرون های *foc*، *sfa*، *pap*، *fim* کد می شوند. ژنوم *UPEC* می تواند بیش از ۱۰ مجموعه ژنی فیمبریایی را کد کند این ارگانل ها بواسطه ی خصوصیات گیرنده های خود طبقه بندی می شوند. برای مثال، فیمبریه تیپ ۱ که باعث هماگلوتیناسیون حساس به مانوز(MSH)^{۷۴} می شود، در سویه های پاتوژنیک و کومنسال پیدا شده است. در مقابل اکثر فیمبریه های اشريشيا کلي پاتوژنیک باعث هماگلوتیناسیون مقاوم به مانوز(MRH)^{۷۵} می شوند فیمبریه ها توسط چندین مسیر شامل مسیر چاپرون-آشر^{۷۶}(فراوان ترین مسیر در سویه های پاتوژنیک *E. coli*) و مسیر*

Mannose Sensitive Hemagglutination^{۷۴}
Mannose Resistant Hemagglutination^{۷۵}
Chaperon-Usher pathway^{۷۶}

Adhesin^{۷۱}
Pilus^{۷۲}
Fimbria^{۷۳}

سرهم بندی پیلی تیپ IV در *E. coli*، سرهم بندی می شوند. بعضی از ادهزین های *E. coli*، معروف به غیر فیمبريال یا نان فیمبريال هستند که با ساختار مرتبط غشای خارجی بی شکل مرتبط است.

۱-۸-۱: آنتی ژن های فاکتور کلونیزاسیون (CFA)^{۷۷}

فاکتورهای کلونیزاسیون، ادهزین های اولیه اشريشيا کلی انترتوکسیژنیک در روده کوچک هستند. بر طبق اطلاعات، چندین عامل مانند املاح صفراوی، گلوکز و اتصال به سلول های اپی تلیال می تواند باعث افزایش بیان فاکتور کلونیزاسیون در شرایط آزمایشگاهی شده است (۴۹). سویه های *ETEC*، ادهزین های آنتی ژن فاکتور کلونیزاسیون مختلفی از لحاظ ایمونولوژیکی بیان می کنند. ادهزین های CFA اتصال باکتری به گیرنده های میزبان را وساطت کرده و باعث سهولت در کلونیزاسیون باکتری در روده کوچک میزبان می شود (۵۰). حداقل ۲۳ ادهزین CFA یا CS (آنتی ژن سطحی کلی) به همراه ۲ انترتوکسین مجزا از هم در سویه های *ETEC* مولد اسهال جدا شده است (۵۰-۵۳). فاکتورهای کلونیزاسیون گروه متنوعی از ساختارهای پروتئینی سطحی هستند که در اتصال *ETEC* به روده کوچک نقش دارد و شامل آنتی ژن فاکتور کلونیزاسیون ۱ و CS₁-CS₆ است به طوری که ممکن است بصورت مستقل و یا در ترکیب با CS₃ که مرتبط با CS₁ و CS₂ است و CS₆ که با CS₄ و CS₅ مرتبط است، باشد. بیشترین مطالعاتی که در رابطه با CF در *ETEC* انجام شده است مربوط به آنتی ژن فاکتور کلونیزاسیون/ فیمبریه تیپ ۱ می باشد که از لحاظ فیلوژنتیکی با هفت فاکتور کلونیزاسیون دیگر که در کلاس پنج فاکتور کلونیزاسیون قرار گرفته شده است. آنتی ژن فاکتور کلونیزاسیون/۱، CS₄ و CS₁₄ بعدها در زیرکلاس ۵a فاکتور کلونیزاسیون (CF5a) قرار گرفت (۵۴).

هفت اپی توپ از CFA (CFA/I, CFA/II(CS₁, CS₂, CS₃), CFA/IV(CS₄, CS₅, CS₆)) در ۸۰٪-۷۰ سویه های *ETEC* بیان شده است (۵۵). به دلیل آنکه سویه های *ETEC*، یکی از ادهزین های CFA یا CS یا هر دو را بیان می کنند. ساخت واکسن در برابر اسهال ناشی از این باکتری با چالش بزرگی همراه شده است (۵۶، ۵۷).

این نوع فیمبریه ها، از فیبرهای گوناگون با طول یک میکرون تا چندین میکرون تشکیل شده اند. آنها از نظر ساختاری، منعطف، طویل، میله ای مارپیچی، سفت و سخت، ضخیم به قطر ۷ نانومتر دارد و در نتیجه پیلی، ظاهری سراسر متفاوت دارد و توسط تعدادی ژن متفاوت شامل ۸ ژن در مجموعه ژنی *fim* کد می شوند، حاوی زیر واحدهای تکراری *FimH* است. همچنین این زیر واحدها به ساختارهای کوتاه ۳ نانومتری نوک فیمبریه که شامل ادهزین *FimH* و دو پروتئین (*FimF* و *FimG*) هستند، متصل می شوند. تقریباً ۸۰ درصد از ایزوله های مدفوعی کومنسال *E. coli*، ادهزین *FimH* را کد می کنند، که فقط به گیرنده های تری مانوز متصل می شود، در حالی که ۷۰ درصد ایزوله های *UPEC*، *FimH* های متنوعی دارند که به دلیل موتاسیون، تمایل آنها را برای گیرنده های تری مانوز و بقایای مونومانوز تقویت می کند. اثبات نقش فیمبریه تیپ ۱ در بیماری انسانی به دلیل وجود این ادهزین در نمونه های کومنسال و پاتوژنیک مشکل است. به ویژه اینکه هیچ تفاوت قابل توجهی در فراوانی ژن *fim* در بین سویه های عامل عفونت مجرای ادراری با ویروالانس کمتر و یا بیشتر، وجود ندارد (۵۸). این فیمبریه توسط مسیر چاپرون-آشر سرهم بندی می شود. با آنکه ژن های *fimB* و *fimE* به اوپرون تیپ ۱ متصل است، ولی *fimX* در جایگاه ژنتیکی گسسته به نام PAI-X (جزیره پاتوژنیسیته مربوط به *FimX*) قرار دارد (۵۹).

۱-۸-۳: ادهزین های غیر فیمبریال (AFA)^{۷۹}

ادهزین غیر فیمبریالی (AFA) در *E. coli* با UTI و به خصوص با پیلونفریت در هنگام بارداری و عود سیستمیت مرتبط است. سویه های *UPEC* این ادهزین ها را با توجه به تروپیسزم^{۸۰} بافت کلیوی بیان می کند. یافته های آزمایشگاهی نشان می دهند که سویه های *E. coli* حاوی ادهزین AFA توانایی ایجاد عفونت های مزمن و برگشت پذیر را دارد (۶۰).

۱-۸-۱-۴: فیمبریه اتصال اگرگاتیو(AAF)^{۸۱}

اولین ادهزین کد شده، ادهزینی است که با فیمبریه قابل مشاهده در سطح باکتری مرتبط نیست و به نام AFA که توسط مجموعه ژنی *afa* کد می شود و در سال ۱۹۴۸ به عنوان ادهزین غیر فیمبریایی نام گذاری شد. خانواده ژنی *afa* شامل چندین مجموعه ژنی مرتبط (اوپرون های *afa, daa, dra*) که بطور قابل ملاحظه ای بیان می شوند زیرا که بوسیله ی ایزوله های *E. coli* مرتبط با اسهال انسانی و حیوانی و یوروپاتوژنیک بیان می شود. همه این اوپرون ها یک سازمان ژنتیکی بسیار شبیه و مرتبط به سطح DNA را منتشر می کنند. برخلاف دیگر ژن های *afa*، ژن *afaE*، بسیار ناهمگون است. ادهزین های خانواده Afa، مورد توجه هستند زیرا که، شامل اعضای فیمبریال و غیر فیمبریال هستند. اگرچه به دلیل شباهت زیاد، بین محصولات ژن های مرتبط با *(AfaB, AfaC)afa* و پروتئین های مؤثر در بیوژنز^{۸۲} ساختمان فیمبریایی، یک مکانیسم تشکیل شبیه پیشنهاد می شود، اما هیچ یک از پروتئین های Afa، همولوژی با دومین های فیمبریایی کلاسیک نشان نمی دهند(۵۸).

۱-۸-۱-۴: پیلی P^{۸۳}

این ادهزین، دومین فاکتور ویرولانسی *UPEC* است که نقش مهمی در ایجاد عفونت بالارونده UTI و پیلونفریت در انسان دارد. آنها مسئولیت اتصال به ماتریکس بافتی و موکوزی دارند و باعث تولید سایتوکاین می شوند. فیمبریه P شامل فیبرهای هتروپلی مورفیک تشکیل شده از زیرواحدهای پروتئینی کد شده توسط اوپرون ژنی *papA-K* می باشد(۶۰). ادهزین مخصوص آن، *PapG(I,II,III)* است که به *GbO₃*، *GbO₄*، *GbO₅* که بر روی سلول های اپیتلیال کلیوی، اریتروسیت ها قرار دارد. از طرفی دیگر، فیمبریه P که دومین فاکتور ویرولانسی شایع *UPEC* است، نقش مهمی در بیماری زایی UTI^{۸۴} بالارونده و پیلونفریت در انسان دارد. (۶۱-۶۳).

۱-۸-۲: تاژک^{۸۵}

تاژک، ساختمان چند جزئی و رشته ای شکل است، که از زیرواحدهای پروتئینی به نام فلاژلین که به آن FliC نیز گفته می شود. تاژک، بهترین اندامک برای تحرک در باکتری است که برای کموتاکسی نیز مورد نیاز است (۶۴، ۶۵). علاوه بر تحرک، یک نقش دیگر که به تاژک مربوط می شود، اتصال است که در گونه های پاتوژنیک و فرصت طلب باکتریایی در مدل های حیوانی و گیاهی به اثبات رسیده است (۶۶، ۶۷).

۱-۸-۳: کپسول^{۸۶}

بعضی از باکتری ها توسط لایه ای پلی ساکاریدی و یا به طور استثناء پروتئینی (مانند باسیلوس آنتراسیس^{۸۷} و باسیلوس لیکنی فرمیس^{۸۸}) به نام کپسول احاطه می شوند و در مواردی نیز یک لایه چسبنده بی شکل و غیره یک پارچه از نظر چگالی و ضخامت، اطراف باکتری قرار می گیرد که این ماده لایه لعابی^{۸۹} نام دارد. کپسول و لایه های لعابی گلیکوکالیس^{۹۰} نیز نامیده می شوند. یکی از فاکتورهای ویروالانس کلیدی که در *UPEC* وجود دارد و در ورود باکتری به سلول میزبان نقش دارد، کپسول پلی ساکاریدی یا آنتی ژن K در سطح سلول باکتریایی است. آنتی ژن کپسولی K1 از جنس پلی ساکارید می باشد. آنتی ژن کپسولی K1 بطور معمول در ارتباط با سویه های اشیریشیا کلی خارج روده ای که باعث مننژیت نوزادی می شود و در ۸۰٪ سویه های اشیریشیا کلی، مولد مننژیت و سپتی سمی نوزادان و دارد. کپسول K₁، *NMEC* را از کشته شدن توسط کمپلمان و باکتریوفاژ^{۹۱} محفوظ می دارد (۱۴، ۶۸، ۶۹).

۱-۸-۴: لیپو پلی ساکارید (LPS)

یکی از فاکتورهای ویروالانس اشیریشیا کلی که در سطح باکتری وجود دارد، لیپو پلی ساکارید است. دیواره سلولی اشیریشیا کلی، شامل غشای خارجی (حاوی لیپو پلی ساکارید و فضای پری پلاسمیک) است (۶۰). در لیپو پلی ساکارید اشیریشیا کلی، لیپید A، جزء سمی مولکول به شمار می رود. لیپید A در قسمت داخلی غشاء خارجی قرار

^{۸۹} Slime layer
^{۹۰} Glycocalyx
^{۹۱} Bacteriophage

^{۸۵} Flagella
^{۸۶} Capsule
^{۸۷} *Bacillus anthracis*
^{۸۸} *Bacillus licheniformis*

دارد و باعث اتصال LPS به غشاء خارجی می شود. LPS این باکتری علاوه بر بعضی اثرات پاتولوژیک مانند افت فشار خون، ایجاد پدیده DIC^{۹۲} (انعقاد درون رگی منتشره)، لوکوپنی^{۹۳} (کاهش لوکوسیت های خون)، باعث مقاومت در برابر واکنش کمپلمان سرم انسان می شود و از باکتری در مقابل اپسونیزاسیون و فاگوسیتوز نیز محافظت می کند (۷۰، ۱۴).

۱-۸-۵: توکسین

توکسین ها، فاکتور های ویروالانس مهمی در ایجاد بیمارهای مختلف ناشی از *E. coli* هستند. این توکسین ها شامل: توکسین کد شده توسط پلازمید (PET)^{۹۴}، شیگا توکسین، وروتوکسین^{۹۵}، انتروتوکسین های حساس به حرارت (LT)، و مقاوم به حرارت (ST) و همولایزین A، و غیره هستند (۷۰-۷۲).

۱-۸-۵-۱: شیگا توکسین (SXT)

اشریشیا کلی مولد شیگا توکسین، گروه پاتوژنیکی از اشریشیا کلی مولد سایتوتوکسین شیگا یا وروتوکسین (Stx) است. این سایتوتوکسین که منشاء فاژی دارد، شبیه به یکی از توکسین های تولید شده توسط شیگلا دیسانتری سروتایپ ۱ است (۷۳). این توکسین از دو زیر واحد پروتئینی تشکیل شده است. زیر واحد A با وزن مولکولی ۳۲۰۰۰ دالتون که مسئول فعالیت سمی پروتئین است. زیر واحد B که از پنج مولکول تشکیل شده است. این زیر واحد که وزن مولکولی معادل ۷۷۰۰ دالتون دارد، مسئول اتصال به انواع خاص سلول است. توکسین بر روی خطوط رگ های خونی یا همان اندوتلیوم واسکولار اثر می گذارد. زیر B، به قسمت شناخته شده ایی از غشای سلول به نام گلیکولیپید گلوبو تری آسیل سرامید (Gb₃) متصل می شود. اتصال زیر واحد B به Gb₃ باعث

Plasmid-encoded Toxin^{۹۴}
Verotoxin^{۹۵}

Disseminated Intravascular^{۹۲}
Coagulation
Leukopenia^{۹۳}

تولید غلاف غشای توبولار نازک که تشکیل توبول های درون غشایی برای هدایت مواد باکتریایی به سلول را انجام می دهد، می شود (۷۴، ۳۰). تولید این توکسین در شرایط فقر آهن افزایش می یابد. (۳۰).

۱-۸-۵-۲: توکسین حساس به حرارت (LT)

این توکسین که در سویه *ETEC* می باشد، از لحاظ اندازه مولکولی، سکانس، آنتی ژنیسیته و عملکرد شبیه توکسین کلرا است. توکسین حساس به حرارت، که منشاء پلازمیدی دارد، یک پروتئین ۸۶ کیلو دالتونی است که از ۲ زیر واحد A و B تشکیل شده است. زیر واحد A یک بخش انزیمی فعال است که توسط پنج زیر واحد اتصالی B احاطه شده است. زیر واحد B به همان گیرنده های گانگلیوزیدی مثل GM_1 ، که به عنوان گیرنده توکسین کلرا مطرح بود، متصل می شود و فعالیت انزیمی آن نیز همانند توکسین کلرا، است (۳۰).

۱-۸-۵-۳: توکسین مقاوم به حرارت (ST)

این توکسین که یکی دیگر از انتروتوکسین های اشیریشیا کلی انتروپاتوژنیک است، توکسینی با اندازه مولکولی پایین، وزن مولکولی پایین (۴۰۰۰ دالتون) و مقاوم به دمای جوش تا ۳۰ دقیقه می باشد. علت مقاومت به دمای جوش در این انتروتوکسین نیز به دلیل اندازه کوچک آن است. چندین نوع از این انتروتوکسین، وجود دارد که از این میان، ST_{1a} یا ST_p در ایزوله های جدا شده از انسان و یا حیوان یافت شده است، در حالی که ST_b یا ST_h بطور فراوان فقط در ایزوله های انسانی یافت شده است. ST_{1a} به واسطه اتصال به **گوانیلات** سیکلاز که در غشای رُسی سلول میزبان قرار گرفته است باعث افزایش گوانوزین مونو فسفات حلقوی (cGMP) در سیتوپلاسم سلول میزبان می شود که این خود باعث ترشح مایعات و الکترولیت ها و در نتیجه ایجاد اسهال، همانند اثر افزایش آدنوزین مونو فسفات حلقوی (cAMP) می شود (۳۰).

۱-۸-۵-۴: همولایزین (Hly A)

مهمترین فاکتور ویروالانس ترشحی اشیریشیا کلی یوروپاتوژنیک، یک لیپوپروتئین به نام آلفا همولایزین است که با UTI بالارونده، همچون پیلونفریت مرتبط است. همولایزین A، توکسینی است با ساختار منفذی شکل که متعلق

به خانواده RTX که در میان پاتوژن های گرم منفی منتشر شده است، می باشد. در غلظت های کم، همولایزین A، ممکن است باعث آپتوز سلول های میزبان مثل: نوتروفیل ها، لمفوسیت T و سلول های کلیوی شود. همچنین این توکسین باعث ورقه ورقه شدن سلول های اپیتلیال مثانه می شود. از طرفی در غلظت های زیاد، همولایزین A باعث تخریب اریتروسیت ها و سلول های هسته دار میزبان می شود. این امر، ممکن است در عبور پاتوژن های خارجی مثل *UPEC* از سد موکوزی، آسیب به سلول ایمنی و دست یابی باکتری به ذخایر آهن و مواد مغذی میزبان نقش داشته باشد. علاوه بر این، همولایزین A، در سلول های اپیتلیال کلیوی، باعث نوسان یون Ca^{2+} می شود، که نتیجه آن افزایش تولید IL-6 و IL-8 است (۶۰). این توکسین عامل تقریباً ۵۰ درصد از تمامی موارد پیلونفریت است (۷۵).

۱-۸-۵ سیدروفور^{۹۶}

بر خلاف سویه های اشیریشیا کلی K₁₂، پاتوتایپ های *ExPEC* بطور معمول چندین سیستم کسب آهن از انتروباکترین را کد می کنند. در این میان، *UPEC*، سیستم های کسب آهن زیادی از جمله: سیدروفورهای سالموچلین^{۹۷}، یرسینیا باکترین^{۹۸} و آئروباکترین^{۹۹} را بیان می کند. سالموچلین، اشکال متنوعی از انتروباکترین^{۱۰۰} است که به واسطه فرایند گلوکوزیلاسیون^{۱۰۱} که بواسطه گلوکوزیل ترانسفراز^{۱۰۲} کد شده توسط مجموعه ژنی *iroA* انجام می شود، اصلاح شده است (۳۵، ۷۶).

۱-۹: بیماری های بالینی

براساس ظهور علائم کلینیکی، اشیریشیا کلی های پاتوژن به گروه های مختلف تقسیم بندی می شوند:

۱- عفونت های داخل روده ای اشیریشیا کلی

۲- عفونت های خارج روده ای اشیریشیا کلی

Enterobactin^{۱۰۰}
Glucosylation^{۱۰۱}
Glucosyl transferase^{۱۰۲}

Siderophore^{۹۶}
Salmochelins^{۹۷}
Yersiniabactin^{۹۸}
Aerobactin^{۹۹}

۱-۹-۱: بیماری های داخل روده ای

سویه های اشریشیا کلی مولد اسهال، به شش زیر گروه تقسیم می شوند که براساس خصوصیت ویرولانسی، مکانیسم بیماری زایی و علائم کلینیکی در اکثر موارد به سروگروه و سروتایپ های خاصی تعلق می گیرند، اسهال شریطی است که شخص روزانه سه بار یا بیشتر مدفوع آبکی دفع می کند. این بیماری، یکی از عوامل اصلی مرگ و میر در کشورهای در حال توسعه و همچنین دومین عامل مرگ کودکان در سراسر دنیا است (۵۰، ۷۰). سویه ی اشریشیا کلی انتروپاتوژنیک، در کودکان، به ویژه در کسانی که بهداشت ضعیف دارند، بصورت اولیه باعث ایجاد، اسهال می شود. سویه ی اشریشیا کلی انترواینویزیو، به صورت مکرر باعث اسهال آبکی و بعضی اوقات دیسانتری در کودکان و افراد بالغ می شود. سویه ی اشریشیا کلی انتروتوکسیژنیک شایع ترین عامل اسهال مسافران با شدت ملایم تا شدید در همه سنین است. سویه ی اشریشیا کلی انترو هموراژیک پاتوژن منتقله از راه دهان است که باعث کولیت خون ریزی دهنده و سندرم اورمی همولایتیک^{۱۰۳} می شود. همچنین، سویه اشریشیا کلی متصل منتشره (DAEC)، باعث اسهال به ویژه در کودکان می شود (60). سیستیت، التهاب مثانه با طیف متنوع و علت نامشخص است. از علائم آن می توان به تکرر ادرار، درد در نواحی پایین شکم، سوزش در ادرار^{۱۰۴} و وجود خون در ادرار^{۱۰۵} اشاره کرد. با اینکه سیستیت بطور معمول ناشی از عفونت باکتریایی است، اما می تواند به واسطه سرطان مثانه، سنگ مثانه، و یا به علت نامشخص دیگری مانند سیستیت روده ای باشد سیستیت خود، به دو کلاس تقسیم بندی می شود: سیستیت ساده و سیستیت پیچیده،

سیستیت ساده، عفونتی در خانم ها است که همراه با نقص در ساختار و عملکرد مثانه می باشد هرچند در سیستیت پیچیده علاوه بر نقص و عملکرد در مثانه، توسعه مقاومت آنتی بیوتیکی نیز وجود دارد. شایع ترین پاتوژن های عامل سیستیت ساده و پیچیده، اشریشیا کلی یوروپاتوژنیک (UPEC)، استافیلوکوک ساپروفیتیکوس، انتروکوک، استافیلوکوک کواگولاز منفی و دیگر انتروباکتریاسه ها است (۷۷، ۷۸).

^{۱۰۵} hemuria

^{۱۰۳} Uremic hemolytic Syndrome
^{۱۰۴} Dysuria

۱-۹-۲: بیماری های خارج روده ای

اشريشيا کلي مولد مننژيت، يک پاتو تايپ^{۱۰۶} مجزا از سويه های اشريشيا کلي خارج روده ای به نام اشريشيا کلي مننژيت نوزادی است. اين باکتری عامل اصلی مننژيت باکتریایی گرم منفی نوزادی، در کشورهای توسعه یافته، همراه با عوارض نورولوژیکی در بسياری از نوزادان نجات یافته از مننژيت است. عفونت مجرای ادراری، شایع ترین عفونت باکتریایی در انسان است و پیشرفت آن وابسته به فاکتورهای آناتوميک مثل: مکانسیم های دفاعی بدن، و ویرو لانس ارگانيسم ها است (۷۹). عفونت ادراری، بر اساس محاسبات، بیش از ۸ ميليون مراجعه کننده و در حدود ۱ ميليون مورد اضطرابی در سال در ایالات متحده رخ می دهد. عفونت مجرای ادراری، یا به عبارتی عفونت سیستم ادراری، تعريف گسترده ای دارد. باکتریمی که به واسطه سويه های پاتوژنيک اشريشيا کلي ایجاد می شود، یکی از عوامل مرگ و مير در جهان است. در میان سويه های اشريشيا کلي، سويه ی اشريشيا کلي یوروپاتوژنيک، عامل اصلی باکتریمی است. عفونت های درمان نشده می تواند منجر به انتشار عفونت های جريان خون مثل باکتریمی شود (۸۰).

عفونت مجرای ادراری، براساس محل عفونت به ۳ بیماری تقسيم بندی می شود:

۱-سیستیت ۲-پیلونفریت ۳-باکتریوری (۴۰).

پیلونفریت حاد، التهاب بدخیم پارانشیم های کلیوی و لگن مرتبط با عفونت کلیوی است. از لحاظ کلینیکی، پیلونفریت حاد، شکل بدخیمی از عفونت مجرای ادراری است که طیف علائم آن از ملایم تا تهدید کننده حیات یا مرگ است. پیلونفریت مزمن، فرآیند التهاب مخرب پارانشیم کلیوی است.

یورتریت^{۱۰۷}، یا التهاب یورترال، در موارد اصلی به وسیله عوامل منتقله جنسی ایجاد می شود. علائمی معمول آن شامل سوزش در ادرار، ناراحتی های نوک آلت تناسلی، سوزش مجرای ادراری است. با این حال یورتریت بطور معمول بدون علامت است. زمانی که عامل یورتریت، نیسریا گونوره^{۱۰۸} باشد، یورتریت از نوع گونوکوکی است و زمانی که عامل، غیر از گونوکوک باشد، یورتریت از نوع غیر گونوکوکی خواهد بود. سرویسیت غیر گونوکوکی خلطی-چرکی و یورتریت در زنان با هم، هم معنی هستند، با این حال از لحاظ تعریفی، قابل بحث اند (۸۱).

^{۱۰۸} *Neisseria gonorea*

^{۱۰۶} Pathotype
^{۱۰۷} Urethritis

۱-۹-۳: سایر بیماری ها

عفونت هایی همچون: اندوکاردیت^{۱۰۹}، آپاندیسیت، عفونت های صفراوی، پریتونیت^{۱۱۰}، سپتی سمی^{۱۱۱} و غیره می تواند ناشی از اشريشيا کلي باشد.

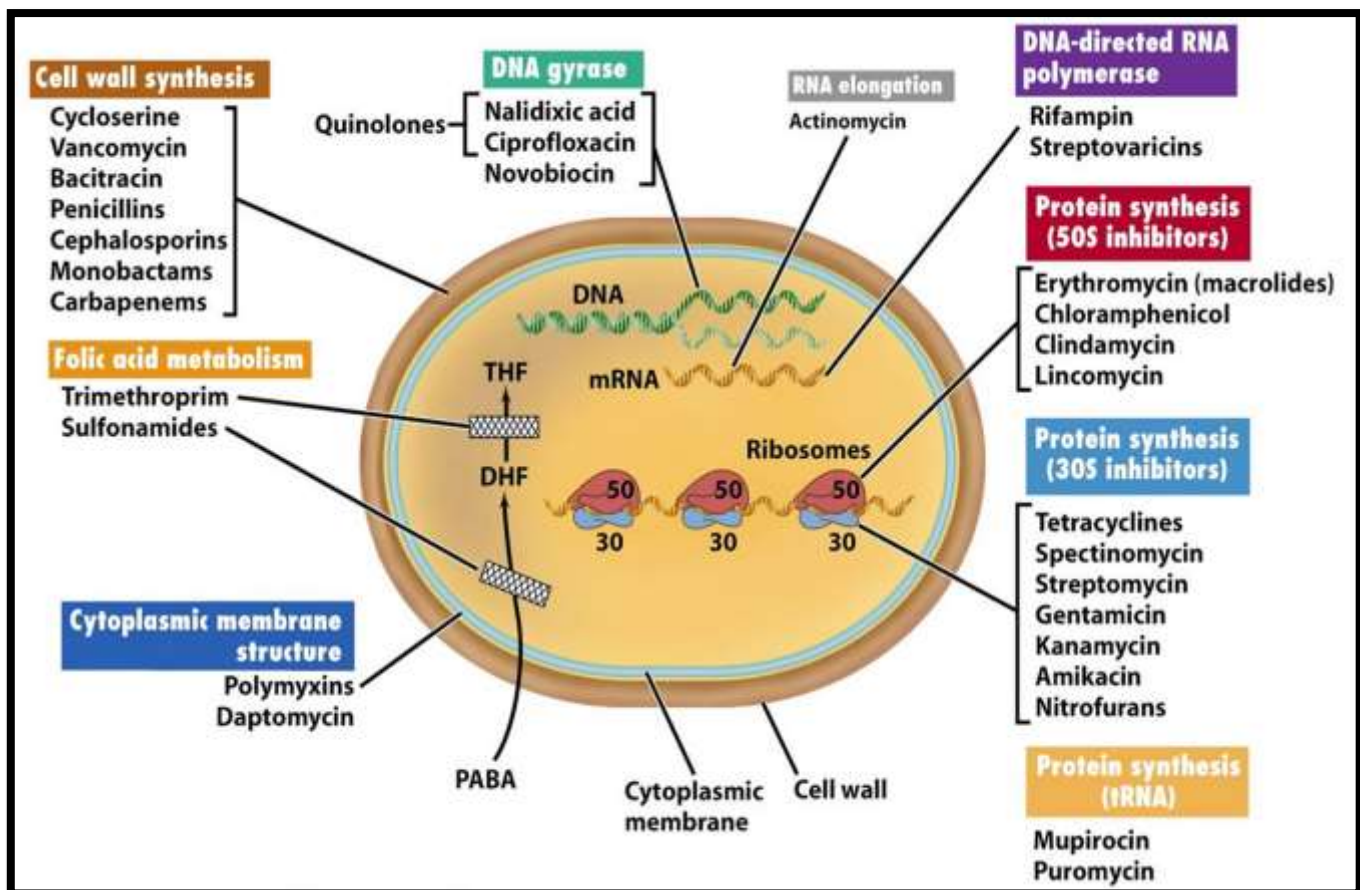
۱-۱۰: آنتی بیوتیک^{۱۱۲}

واژه آنتی بیوتیک، به معنای ماده شیمیایی است که توسط میکروارگانیسم ها تولید شده و اثر مهاری و یا کشندگی بر روی میکروارگانیسم های دیگر دارد. بنابراین داروهای مهمی هستند. تاریخچه آنتی بیوتیک به سال ۱۹۳۲ بر می گردد، زمانی که اولین سولفانامید^{۱۱۳} برای اولین بار توسط میکروب شناس آمریکائی به نام سلمن واکسمن^{۱۱۴} ساخته شد. در سال ۱۹۴۰ تا ۱۹۶۰ واژه آنتی بیوتیک از واژه داروی کموتروپیک به لحاظ اینکه آنتی بیوتیک ها داروهای طبیعی ساخته شده توسط قارچ ها یا باکتری ها هستند، جدا شد. هرچند استفاده از آنتی بیوتیک ها فقط در اواسط قرن اخیر مطرح شد، اما مدارکی مبنی بر استفاده از میکروارگانیسم ها برای مدیریت عفونت های میکروبی در مصر باستان، یونان، چین و دیگر نقاط جهان وجود دارد. با این حال دوران جدید آنتی بیوتیک با کشف پنی سیلین^{۱۱۵} به وسیله الکساندر فلمینگ^{۱۱۶} در سال ۱۹۲۸ آغاز شد. وی با کشت قارچی به نام پنی سیلیوم نوتاتوم^{۱۱۷} موفق به کشف این آنتی بیوتیک شد (۸۲-۸۴). آنتی بیوتیک ها می توانند به وسیله درمان و یا جلوگیری از بروز بیماری ها زندگی انسان ها را بهبود بخشند. هرچند که امروزه مقاومت به آنتی بیوتیک ها یا افزایش پایداری باکتری ها در حضور آنتی بیوتیک یک تهدید بزرگ سلامتی به شمار می رود. علاوه بر این، آنتی بیوتیک ها فقط برای درمان عفونت های باکتریایی به کار می روند و برای عفونت های مرتبط با ویروس ها مانند سرما خوردگی به کار نمی روند. تعدادی از این آنتی بیوتیک های با اهمیت، بر روی دیواره سلولی اثر می گذارند مانند: بتا لاکتام^{۱۱۸} ها و گلیکوپپتید^{۱۱۹} ها، در حالی که بعضی دیگر، فعالیتشان به واسطه اثر مهاری روی پروتئین سازی و زیرواحد های ریبوزومی گسترش یافته

Penicillin^{۱۱۵}
Alexander Fleming^{۱۱۶}
Penicillium notatum^{۱۱۷}
βlactams^{۱۱۸}
Glycopeptid^{۱۱۹}

Endocarditis^{۱۰۹}
Peritonitis^{۱۱۰}
septicemia^{۱۱۱}
Antibiotic^{۱۱۲}
Sulfonamid^{۱۱۳}
Selman walksman^{۱۱۴}

است مانند: ماکرولید^{۱۲۰}، کلرامفنیکل^{۱۲۱}، تتراسیکلین^{۱۲۲}، لاینزولید^{۱۲۳} و آمینوگلیکوزید^{۱۲۴}. گروهی دیگر سنتز نوکلئیک اسید را مهار می کنند مانند: فلوروکینولون^{۱۲۵} و ریفامپین^{۱۲۶}، و گروهی دیگر روی مسیرهای متابولیکی، مداخله می کنند مانند: سولفانامیدها، آنالوگ فولیک اسید^{۱۲۷} و گروهی دیگر، ساختارهای غشایی را تخریب می کنند مانند: پلی میکسین^{۱۲۸}، داپتومایسین^{۱۲۹} و غیره (۸۵).



شکل ۱-۱= مکانیسم اثر آنتی بیوتیک ها بر سلول هدف (۸۶)

Fluoroquinolone^{۱۲۵}
Rifampine^{۱۲۶}
Folic acid^{۱۲۷}
Polymyxine^{۱۲۸}
Daptomycin^{۱۲۹}

Macrolide^{۱۲۰}
Chloramphenicol^{۱۲۱}
Tetracycline^{۱۲۲}
Linezolid^{۱۲۳}
Aminoglycoside^{۱۲۴}

۱-۱۰-۱: بتالاکتام

بتا لاکتام ها، به یک خانواده از آنتی بیوتیک تعلق دارند که این خانواده توسط یک حلقه بتالاکتام شناسایی می شوند. تمامیت و انسجام حلقه بتالاکتامی برای فعالیت این خانواده آنتی بیوتیکی لازم و ضروری است. (۸۷). در سال ۱۹۲۹، الکساندر فلمینگ اثر باکتری کشی (باکتریوسیدالی) پنی سیلیوم نوتاتوم را مشاهده کرد و برطبق مشاهده خود اولین آنتی بیوتیک بتالاکتام را پنی سیلین نامید.

بعدها آنتی بیوتیک های بتالاکتام متنوع دیگری همچون پنم^{۱۳۰} هاداروهای مشتق شده از پنی سیلین (سفالوسپورین^{۱۳۱} (سغم ها)،^{۱۳۲} مونوباکتام^{۱۳۳} ها و کارباپنم^{۱۳۴} ها کشف و یا شناسایی شدند. همه آن ها حاوی یک حلقه ی ۴ ضلعی موسوم به حلقه بتالاکتام هستند. این حلقه بتالاکتام، از لحاظ ساختاری بسیار شبیه به اسکلت د-آلنین-د-آلنین^{۱۳۵} می باشد. این اسکلت ساختاری در واقع به عنوان پروتئین متصل شونده به پنی سیلین (PBP)^{۱۳۶} مطرح است. بنابراین پنی سیلین شبیه سوبسترا عمل می کند و برای مهار سنتز پل های عرضی پپتیدوگلیکان^{۱۳۷} به ناحیه فعال ترنس پپتیداز^{۱۳۸} متصل می شود. عمل آنتی بیوتیک های بتالاکتام باعث می شود تا یک سری از ترنس پپتیداز هایی که واکنش های نهایی پل های عرضی^{۱۳۹} در سنتز پپتیدوگلیکان را کاتالیز می کنند، غیر فعال شوند. این دارو ها برای درمان سودوموناس آئروژینوزا مناسب بودند، ولی بعد از مدتی برخی از باکتری ها با تولید بتالاکتاماز به این آنتی بیوتیک ها مقاومت نشان دادند (۸۷، ۸۸).

آنتی بیوتیک های بتالاکتام بیوسنتز دیواره سلولی باکتریایی را مهار می کنند. در نتیجه شرایط را برای لیز سلولی و مرگ فراهم می کند. به طور ویژه، آنتی بیوتیک های بتالاکتام به پروتئین متصل شونده به پنی سیلین (PBP) که برای بیوسنتز دیواره سلولی باکتری ضروری است متصل می شود ناحیه فعال آن ها را اسيله می کند (۸۲). به طور کلی ۵ نوع PBP در اشریشیا کلی وجود دارد:

• PBP-1(PBP-1a,PBP-1b)

• PBP-2

D-Ala, D-Ala^{۱۳۰}
Penicillin-Binding Protein^{۱۳۶}
Peptidoglycan^{۱۳۷}
Transpeptidase^{۱۳۸}
Cross-bridge^{۱۳۹}

Penem^{۱۳۰}
Cephalosporine^{۱۳۱}
Cephem^{۱۳۲}
Monobactam^{۱۳۳}
Carbapenem^{۱۳۴}

- PBP-3
- PBP-5
- PBP-6 (89).

۱-۱۰-۱: ساختمان شیمیایی بتالاکتام

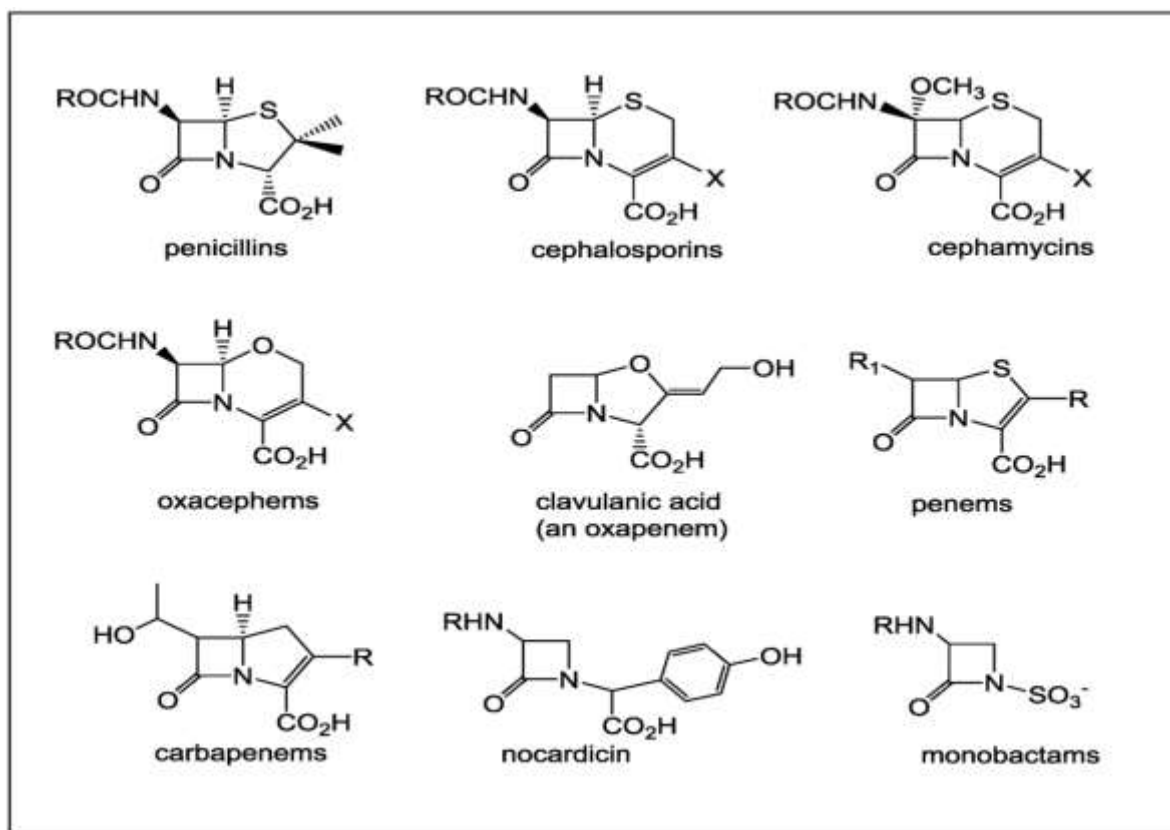
پنی سیلین ها شامل یک هسته دو حلقوی پنم که توسط بتالاکتام های آمیخته شده، شکل گرفته است و حلقه های تiazolidine^{۱۴۰} که شامل سولفور است و زنجیره جانبی آسیل متصل شده به گروه کربن ۶ می باشد. زنجیره ی جانبی به پیش سازهای موجود در محیط کشت وابسته است. اتصال زنجیره جانبی، بطور نسبی غیر اختصاصی است. پنی سیلین های طبیعی، مثل پنی سیلین^{۱۴۱}F (حاوی زنجیره جانبی از نوع ۳-هگزنوئیک) و پنی سیلین^{۱۴۲}K (حاوی زنجیره جانبی از نوع اکتانوئیک اسید)، تحت شرایط طبیعی ساخته می شوند. با این حال محیط های کشت حاوی فنیل استیک یا فنوکسی استیک اسید به ترتیب، باعث ساخته شدن بنزیل پنی سیلین (پنی سیلین^{۱۴۳}G) یا فنوکسی متیل پنی سیلین (پنی سیلین^{۱۴۴}V) می شود (۹۰).

۱-۱۰-۲: انواع آنتی بیوتیک های بتالاکتام

آنتی بیوتیک های بتالاکتام در حال حاضر شامل شش دسته: پنی سیلین ها، سفالوسپورین ها، سفامایسین^{۱۴۵} ها، کارباپنم^{۱۴۶} ها، مونوباکتام^{۱۴۷} ها، و مهار کننده های بتالاکتاماز^{۱۴۸} تقسیم بندی می شوند

Cephamycin^{۱۴۵}
Carbapenem^{۱۴۶}
Monobactam^{۱۴۷}
Blactamase inhibitor^{۱۴۸}

Thiazolidine^{۱۴۰}
Penicillin F^{۱۴۱}
Penicillin K^{۱۴۲}
Penicillin G^{۱۴۳}
Penicillin V^{۱۴۴}



شکل ۲-۱: ساختمان شیمیایی آنتی بیوتیک های خانواده بتالاکتام (91)

۱-۱۰-۱-۲-۱ پنی سیلین

همه پنی سیلین ها دارای یک ساختمان اصلی مشابه هستند. در این گروه از آنتی بیوتیک ها، حلقه تiazolidine به یک حلقه بتالاکتام اتصال می یابد و یک گروه آمینی آزاد را حمل می کنند. بنیان های اسیدی که با گروه آمینی پیوند یافته اند، می توانند به وسیله آمیداز باکتری ها شکسته شوند. حفظ ساختمان هسته اسیدی آمینو پنی سیلانیک برای فعالیت ترکیبات پنی سیلین ضروری است. اگر حلقه بتالاکتام توسط انزیم بتالاکتاماز (پنی سیلیناز) شکسته شود، ترکیب حاصل یعنی پنی سیلونیک اسید فعالیت ضد میکروبی خود را از دست خواهد داد (۳۶).

پنی سیلین طبیعی شامل:

۱- پنی سیلین G (بنزیل پنی سیلین)^(۱۴۹)

۲- پنی سیلین V (فنوکسی متیل پنی سیلین)^(۱۵۰)

۳- پنی سیلین F

پنی سیلین های نیمه صناعی با طیف گسترده

۱- آموکسی سیلین^{۱۵۱}

۲- آمپی سیلین^{۱۵۲}

۳- مزلوسیلین^{۱۵۳} و پیراسیلین^{۱۵۴}

۴- کاربنی سیلین^{۱۵۵}

۵- تیکارسیلین^{۱۵۶}

پنی سیلین های نیمه صناعی مقاوم به بتالاکتاماز

۱- متی سیلین^{۱۵۷}

۲- نفی سیلین^{۱۵۸}

۳- کلواگزاسیلین^{۱۵۹}

۴- اگزاسیلین^{۱۶۰}

۵- دی کلواگزاسیلین^{۱۶۱}

۶- پنی سیلین های همراه با مهارکننده های بتالاکتاماز

۱- آموکسی سیلین+کلاوولانیک اسید^{۱۶۲}

۲- تیکارسیلین+کلاوولانیک اسید

۳- پیراسیلین+تازوباکتام^{۱۶۳}

۴- آمپی سیلین+سولباکتام(15)^{۱۶۴}

۱- ۱۰- ۱- ۲- سفالوسپورین ها:

Nafcillin^{۱۵۸}
Cloxacillin^{۱۵۹}
Oxacillin^{۱۶۰}
Dicloxacillin^{۱۶۱}
Clavulanic acid^{۱۶۲}
Tazobactam^{۱۶۳}
Sulbactam^{۱۶۴}

Amoxicillin^{۱۵۱}
Ampicillin^{۱۵۲}
Mezlocillin^{۱۵۳}
Piperacillin^{۱۵۴}
Carbenicillin^{۱۵۵}
Ticarcillin^{۱۵۶}
Methicillin^{۱۵۷}

سفالوسپورین ها، شایع ترین کلاس آنتی بیوتیکی در درمان عفونت های باکتریایی است. سفالوسپورین ها، دارای یک هسته آمینوسفالوسپورانیک اسید^{۱۶۵} هستند که از یک حلقه بتالاکتام متصل به یک شش ضلعی دی هیدروتیازین^{۱۶۶} تشکیل شده است. هسته ی آن که در هیدرولیز اسیدی ایجاد می شود، تحت تأثیر تغییراتی قرار می گیرد که از آن جمله می توان به جانشینی در ریشه ۳ و ۷ اشاره کرد که فعالیت ضد میکروبی و خصوصیات آن را تغییر می دهد. سفالوسپورین ها در برابر اغلب ارگانسیم های حساس به پنی سیلین مؤثر بوده و جانشین مفیدی در این موارد است. سفالوسپورین ها، همانند پنی سیلین ها، از طریق اختلال در عملکرد انزیم های ترنس پپتیداز انجام داده و مانع سنتز دیواره سلولی در باکتری ها می شوند، این دارو ها از لحاظ کلینیکی، مؤثر، ایمن، و از لحاظ استفاده آسان هستند. سفالوسپورین های وسیع الطیف شامل: سفوتاکسیم^{۱۶۷}، سفتریاکسون^{۱۶۸} و سفتازیدیم^{۱۶۹}، به تنهایی و یا در ترکیب با دیگر آنتی بیوتیک ها، به عنوان شایع ترین آنتی بیوتیک در آغاز درمان تجربی برای عفونت های جدی محسوب می شوند. اولین نسل از سفالوسپورین ها، فعالیت خوبی در برابر باکتری های گرم مثبت دارد و به طور نسبی بر روی باکتری های گرم منفی نیز اثر می گذارد. دومین نسل از سفالوسپورین ها، بیشتر بر روی میکروارگانسیم های گرم منفی اثر می گذارد ولی به اندازه تأثیر نسل سه سفالوسپورین ها نیست. نسل چهارم از سفالوسپورین ها، به طور ویژه برای درمان تجربی عفونت های جدی در بیماران بستری در بیمارستان که با انتروباکتریاسه و پسودوموناس بیمار شده اند، مفید است (۹۲).

سفالوسپورین های نسل اول:

۱- سفالکسین^{۱۷۰}

۲- سفالوتین^{۱۷۱}

۳- سفازولین^{۱۷۲}

۴- سفاپیرین^{۱۷۳}

۵- سفرادین^{۱۷۴}

Cephalexin^{۱۷۰}
Cephalotin^{۱۷۱}
Cephazolin^{۱۷۲}
Cephaphirin^{۱۷۳}
Cephhradine^{۱۷۴}

Aminocephalosporinic acid^{۱۶۵}
Dihydrothiazin^{۱۶۶}
Cefotaxime^{۱۶۷}
Ceftriaxone^{۱۶۸}
Ceftazidime^{۱۶۹}

سفالوسپورین های نسل دوم:

۱-سفاکالر^{۱۷۵}

۲-سفوروکسیم^{۱۷۶}

سفالوسپورین های نسل سوم

۱-سفتریاکسون

۲-سفیکسیم^{۱۷۷}

۳-سفتوتاکسیم^{۱۷۸}

۴-سفتازیدیم^{۱۷۹}

سفالوسپورین های نسل چهارم

۵-سفه پیم^{۱۸۰}(۱۴)

سفالوسپورین های نسل پنجم

سفتارولین^{۱۸۱}

سفتابیپرول^{۱۸۲}(14)

۱-۱۰-۱-۲-۳: مونوباکتام^{۱۸۳}

آزترونام^{۱۸۴}، عضو مونوباکتام ها است و از لحاظ وجود زنجیره جانبی آسیلامینو مانند سفتازیدیم است (-Extended

spectrum beta-lactamases). آزترونام، از باکتری به نام کروموباکتریوم ویولاسئوم^{۱۸۵} جدا شده است. این دارو

به بعضی از بتالاکتامازها، مقاوم است، اما توسط بتالاکتامازهای وسیع الطیف غیرفعال می شود. این دارو بر علیه

Ceftaroline^{۱۸۱}
Ceftobiprole^{۱۸۲}
Monobactam^{۱۸۳}
Aztreonam^{۱۸۴}
Chromobacterium Violaceum^{۱۸۵}

Cefaclor^{۱۷۵}
Cefuroxime^{۱۷۶}
Cefixime^{۱۷۷}
Cefotaxime^{۱۷۸}
Ceftazidime^{۱۷۹}
Cefepime^{۱۸۰}

سیتروباکتر^{۱۸۶}، انتروباکتر^{۱۸۷}، اشريشيا کلی، هموفیلوس^{۱۸۸}، کلبسیلا^{۱۸۹}، پروتئوس^{۱۹۰} و گونه های سراشیا^{۱۹۱} اثر دارد (۹۳). آزترونام، مشابه پنی سیلین، سنتز موکوپپتید را در دیواره سلولی مهار می کند و در نتیجه تشکیل پل های عرضی در پپتیدوگلیکان را مهار می کند. آزترونام تمایل بالایی به اتصال با پروتئین متصل شونده به پنی سیلین-۳ (PBP-3) از خود نشان می دهد و برعکس، تمایل نسبتاً کمی برای اتصال با پروتئین متصل شونده به پنی سیلین-۱ا (PBP-1a) از خود نشان می دهد (۹۴).

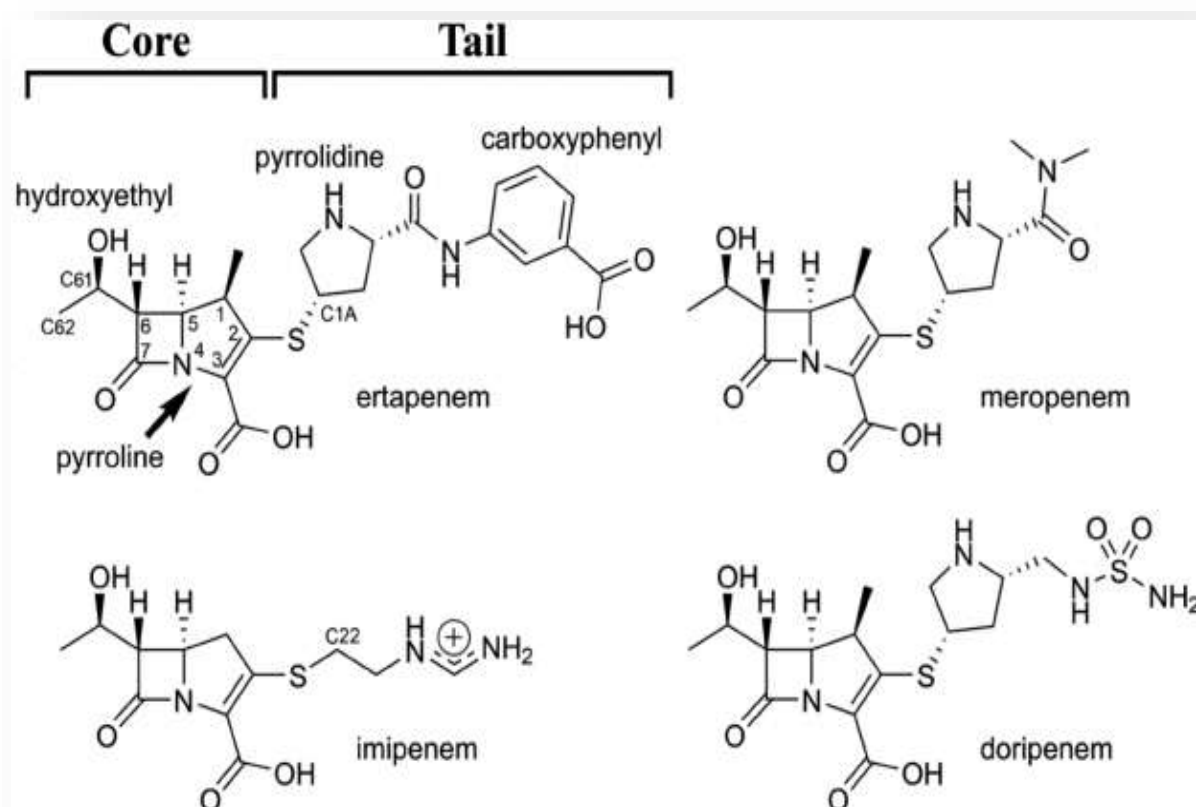
۱-۱۰-۱-۲-۴ کارباپنم^{۱۹۲}

کارباپنم ها، که آنتی بیوتیک های باکتریوسیدال^{۱۹۳} (باکتری کش) هستند، حاوی حلقه بتالاکتام با یک زنجیره جانبی هیدروکسیل استیل ترکیب شده (فاقد اتم اکسیژن یا سولفور در هسته دو حلقه ای خود) می باشد (۸۹، ۹۵). کارباپنم ها نقش مهم و حیاتی به عنوان ابزار آنتی بیوتیکی ایجاد می کند. در میان صدها هزار بتالاکتام متفاوت، کارباپنم ها (به استثناء ارتاپنم که بر روی پسودوموناس^{۱۹۴}، اسینتوباکتر بومانی^{۱۹۵} تأثیر ندارد) شامل وسیع ترین طیف فعالیت و بیشترین قدرت بر علیه باکتری های مثبت (به استثناء استافیلوکوکوس اورئوس مقاوم به متی سیلین، انتروکوکوس فسیوم، انتروکوکوس فکالیس) و باکتری های گرم منفی (به استثناء استنوتروفوموناس مالتوفیلیا) و گونه های بی هوازی باکتریایی است. به خاطر همین، این دسته از آنتی بیوتیک ها برای بیمارانی که به شدت بیمار هستند و یا مشکوک به باکتری مقاوم اند به عنوان عوامل خط پایانی یا راه حل آخر آنتی بیوتیکی مطرح هستند (۸۹، ۹۶-۱۰۰). همچنین با وجود افزایش ارگانیزم های مولد بتالاکتامازهای وسیع الطیف (ESBLs)^{۱۹۶}، و افزایش مقاومت به دلیل بتالاکتامازها یا کارباپنمازهایی مانند KPC^{۱۹۷}، NDM^{۱۹۸} هنوز هم، کارباپنم ها نقش بزرگی در درمان عفونت های مهم دارد (۱۰۱، ۱۰۲). اولین کارباپنم تینامایسین^{۱۹۹} بود و به عنوان یک الگو و یا نمونه برای دیگر کارباپنم ها به کار رفت که منجر به ساخته شدن دیگر کارباپنم ها شد (۱۰۳، ۱۰۴). در این میان کشف تینامایسین،

Bacteriocidal^{۱۹۳}
Pseudomonas^{۱۹۴}
Acinetobacter baumannii^{۱۹۵}
Extended-Spectrum β lactamase^{۱۹۶}
Klebsiella pneumonia Carbapenemase^{۱۹۷}
New Delhi Metallo β lactamase^{۱۹۸}
Thienamycin^{۱۹۹}

Citrobacter^{۱۸۶}
Enterobacter^{۱۸۷}
Haemophilus^{۱۸۸}
Klebsiella^{۱۸۹}
Proteus^{۱۹۰}
Serattia^{۱۹۱}
Carbapenem^{۱۹۲}

مهم بود. تینامایسین از باکتری استرپتومایسس کالیته^{۲۰۰} بدست آمد. همانند دیگر بتالاکتام ها، تینامایسین به پروتئین های متصل شونده به پنی سیلین (PBP) متصل می شود. واژه کارباپنم به معنی ۴ حلقه فیوز شده از ۵ حلقه لاکتام پنی سیلین با ۲ پیوند بین C-2 و C-3 است اما در آن کربن در C-1 با سولفور جایگزین شده است. بر طبق مطالعات انجام شده بر روی کارباپنم ها، اتم کربن در وضعیت C-1، نقش اصلی در قدرت و طیف پایداری کارباپنم ها در برابر بتالاکتامازها دارد (۱۰۵).



شکل ۳-۱: ساختمان شیمیایی آنتی بیوتیک های گروه کارباپنم (۱۰۶)

به طور قابل توجهی، تینامایسین فعالیت مهار کنندگی بتالاکتامازی و قدرت آنتی باکتریایی وسیع الطیفی را نشان می دهد. با آنکه این دارو، محصول طبیعی است (از راه بیوسنتز به وجود می آید) اما به مقدار کم از راه فرآیند های تصفیه نیز به وجود می آید. کارباپنم ها، در شرایط آزمایشگاهی، یک طیف سراسری آنتی میکروبی گسترده تر، بر

علیه ، پنی سیلین ها، سفالوسپورین ها و ترکیب بتالاکتام با مهار کننده های بتالاکتام نشان می دهد(۱۰۷). در کل، ایمپی پنم^{۲۰۱}، پانی پنم^{۲۰۲} و دوری پنم^{۲۰۳}، آنتی بیوتیک های قوی در برابر باکتری های گرم مثبت هستند و مروپنم^{۲۰۴}، بیاپنم^{۲۰۵}، ارتاپنم^{۲۰۶} و دوری پنم، فعالیت اندکی در برابر ارگانسیم های گرم منفی دارد.

ایمپی پنم، یکی از وسیع الطیف ترین آنتی بیوتیک های بتالاکتام است. این دارو به دی هیدروپتیداز^{۲۰۷} در توبول های کلیوی حساس است و همواره با سیلاستاتین^{۲۰۸} تجویز می شود.

طیف فعالیت اثر مروپنم مشابه ایمپی پنم می باشد، اما به دی هیدروپتیداز کلیوی مقاوم بوده و عوارض جانبی کمتری دارد. گونه های مختلف *Pseudomonas*^{۲۰۹} به سرعت به ایمپی پنم مقاوم می شوند، بنابراین در این موارد باید به همراه یک آمینوگلیکوزید تجویز شود، همانند کلاس بتالاکتام ها، کارباپنم ها به راحتی در میان دیواره سلولی باکتریایی منتشر نمی شوند. کارباپنم ها، از طریق پروتئین غشای خارجی به نام پورین^{۲۱۰} ها در باکتری های گرم منفی، وارد باکتری می شود. بعد از انتقال از فضای پری پلاسمیک، کارباپنم ها به صورت همیشگی، PBP ها را اسیله می کند. مکانسیم عملکرد کارباپنم ها، بر مبنای مهارکننده های انزیم پتیداز (مربوط به PBP) است که می تواند تشکیل پل های عرضی پتیدی همانند دیگر پتیدازها را مهار کند هر کدام از کارباپنم ها، بر روی یک نوع PBP اثر می گذارند برای مثال: ایمپی پنم بر روی PBP 1a,1b و PBP 5 اثر می گذارد، دوری پنم بیشتر بر روی PBP 2، مروپنم بر روی PBP 3 و PBP 6 اثر می گذارد. عامل اصلی و کلیدی اثرگذاری کارباپنم ها، توانایی آنها در اتصال به چندین PBP متفاوت است(۸۹، ۱۰۸). کارباپنم ها، به عنوان آخرین عامل برای درمان عفونت های ناشی از ایزوله های با مقاومت چند دارویی مطرح هستند(۱۰۹-۱۱۱) مروپنم، کارباپنم وسیع الطیفی است که به طور معمول در درمان عفونت های شدید به کار می رود(۱۱۲).

دوری پنم ها در شرایط آزمایشگاهی طیف فعالیت بیشتری بر علیه باکتری های گرم مثبت و گرم منفی شامل انتروباکتریاسه های مولد ESBLs و AmpC و پاتوژن های بی هوازی دارند. فعالیت دوری پنم و ایمپی پنم بر روی استرپتوکوک های گروه ویریدنس بیشتر از ارتاپنم است(۱۱۳).

Ertapenem^{۲۰۶}
Dihydropeptidase 1^{۲۰۷}
Cilastatin^{۲۰۸}
Pseudomonas^{۲۰۹}
Porin^{۲۱۰}

Imipenem^{۲۰۱}
Panipenem^{۲۰۲}
Doripenem^{۲۰۳}
Meropenem^{۲۰۴}
Biapenem^{۲۰۵}

با آنکه این دسته از آنتی بیوتیک ها باکتریوسیدال هستند اما به واسطه مکانیسم های مقاومت به بتالاکتام ها فعالیت باکتریوسیدالی آن ها می تواند از دست رود (۸۹).

۱-۱۰-۲ مکانیسم مقاومت به بتالاکتام ها

مکانیزم کاهش نفوذپذیری

- ۱- به دلیل از دست دادن پورین ها و یا از دست دادن پروتئین های غشاء خارجی (OmpS, OmpC, OmpF)
- ۲- کاهش بیان پروتئین های غشای خارجی oprD که ممکن است به واسطه جهش در ژنهای تنظیم کنندگی *marR* و بیان پورین های غشایی نظیر *yedS* باشد.
- ۳- یا مکانیسم های ترکیبی چون کاهش نفوذپذیری و تولید زیاد برخی از بتا لاکتامازها همچون AmpC بتا لاکتامازها و برخی ESBLs

وجود سیستم پمپهای افلاکس که سبب خارج کردن دارو به خارج از باکتری (Efflux Pump) می باشد (۱۱۴-۱۱۶).

۱-۱۰-۱-۲ : سیستم ایفلاکس^{۲۱۱}

سیستم های ایفلاکس چند دارویی، به طور قابل ملاحظه ای در مقاومت چند دارویی در باکتری ها افزایش یافته است. یکی از چالش های اصلی در پیشرفت آنتی بیوتیک های مؤثر در برابر پاتوزن های با مقاومت چند گانه، شناسایی ترکیباتی است که می تواند با عملکردهای ایفلاکس مقابله کند. اطلاعات زیاد در رابطه با ژنومیکس^{۲۱۲} باکتریایی، حضور سیستم های ایفلاکس متنوع در باکتری ها را نشان می دهد، به طوری که حتی، یک باکتری منفرد هم، حاوی خانواده های مختلفی از چندین ایفلاکس است (۱۱۷).

۱-۱۰-۲-۲: تغییر در پروتئین متصل شونده به پنی سیلین (PBP)

PBP ها، انزیم هایی همانند: ترنس گلیکوزیلاز^{۲۱۳}، ترنس پپتیداز^{۲۱۴} و کربوکسی پپتیداز^{۲۱۵} هستند که در تشکیل پپتیدوگلیکان در دیواره سلولی باکتری نقش دارد (۱۱۸).

۱-۱۰-۲-۳: بتالاکتاماز

چهار کلاس از بتالاکتاماز شناسایی شده است، که در این میان کلاس مولکولی A,D,C بتالاکتاماز، حاوی سرین^{۲۱۶} در جایگاه فعال خود هستند، در حالی که بتالاکتاماز های کلاس B، حاوی روی^{۲۱۷} در جایگاه فعال خود هستند (۱۱۹). ژن های کد کننده کاربپنماز، به طور معمول بر روی پلازمیدهای بزرگی قرار دارد، که نقش مهمی در انتشار گسترده جهانی این ژن ها دارد. پلازمیدهایی از رپلیکون^{۲۱۸} های متفاوت، یا انواعی از رپلیکون های ناسازگار شامل IncA/C، FII، L/M، H₁₂ که به صورت شایعی با حمل و انتقال ژن های کد کننده کاربپنماز مرتبط است (۱۲۰).

۱-۱۰-۲-۳-۱ طبقه بندی بتالاکتامازها

با پیدایش انزیم های بتالاکتاماز در میان باکتری ها، پدیده مقاومت در بسیاری از آن ها، به خصوص باکتری های ایجاد کننده عفونت های بیمارستانی در حال افزایش است. در نتیجه، درمان عفونت های ناشی از آن ها را با مشکلات جدی روبرو ساخته است. بتالاکتاماز ها به دو صورت مولکولی (Ambler) و عملکردی (Bush-Jacoby-medeiros) طبقه بندی می شوند. طبقه مولکولی توسط Ambler در سال ۱۹۸۰، هنگامی که فقط سکانس چهار اسید آمینه از بتالاکتاماز ها شناسایی شده بود، صورت گرفت. بتالاکتامازها براساس ساختار اولیه به چهار کلاس مولکولی A تا D تقسیم می شوند (121, 122).

کاربپنمازهای کلاس A: که باعث هیدرولیز پنی سیلین ها و سفالوسپورین ها می شود. و دو نوع است:

۱- کاربپنماز های کلاس A با منشاء کروموزومی (NmcA, Sme, IMI-1, SFC-1)

Serine^{۲۱۶}
Zinc^{۲۱۷}
Replicon^{۲۱۸}

Transglycosilase^{۲۱۳}
Transpeptidase^{۲۱۴}
Carboxypeptidase^{۲۱۵}

۲- کارباپنماز های کلاس A با منشاء پلازمیدی (کارباپنماز های کلبسیلا پنومونیه [KPC] ، IMI-2 ، GES). NmcA اولین کارباپنمازی است که در سال ۱۹۹۳ در انتروباکتریاسه ها دیده شد. در این کلاس از کارباپنماز KPC، شایع ترین انزیم است. اولین KPC به نام KPC-2 (در کلبسیلا پنومونیه) در سال ۱۹۹۶ در شرق ایالات متحده شناسایی شد ویژگی این دسته از کارباپنماز این است که کارباپنم ها را هیدرولیز می کنند و خودشان نیز به طور جزئی توسط کلاوولانیک اسید هیدرولیز می شوند (۱۲۱-۱۲۵).

کلاس یک، کلاس مولکولی C (سفالوسپوریناز) است. این کلاس، به مهار شدن توسط کلاوولانیک اسید مقاوم است، گروه دو، پنی سیلینازها، سفالوسپورینازها و یا هردو هستند که به مهار شدن توسط کلاوولانیک اسید مقاوم هستند و برابر با کلاس مولکولی A و D است و حاوی ژن هایی مانند TEM^{۲۱۹} و SHV^{۲۲۰} است. همچنین، بسیاری از بتالاکتامازهای TEM کلاس A توسط پروتئین های مهار کننده بتالاکتاماز، مهار می شوند. به دلیل افزایش در تعداد بتالاکتاماز های مشتق شده TEM و SHV، گروه دو، به دو زیر کلاس ۲a و ۲b تقسیم می شود.

گروه ۲a از کلاس A، که فقط حاوی پنی سیلیناز ها است. گروه ۲b از کلاس A، وسیع الطیف هستند. بدین معنی که، توانایی غیر فعال کردن پنی سیلیناز ها و سفالوسپوریناز ها را دارد. گروه ۲b، خود به ۲be، ۲br، ۲c، ۲d، ۲e، ۲f تقسیم می شود. گروه ۲be، از گروه A، طیف گسترده است که به نام ESBLs، معروف است، توانایی غیر فعال کردن سفالوسپورین های نسل سوم (شامل: سفنازیدیم، سفوتاکسیم و سفپودوکسیم^{۲۲۱}) را به خوبی مونوباکتام ها (آزترونام) دارد. گروه ۲br، از گروه A، مقاوم به مهار کننده ها که خصوصیت مهار کنندگی کلاوولانیک اسید و سولباکتام را محدود می کند که به آن ها، انزیم های مشتق از TEM مقاوم به مهار کننده، با این حال آن ها به تازوباکتام حساس اند به جزء زمانی که در موقعیت met₆₉ جایگاه یک آمینو اسید تغییر کند. گروه ۲c، از گروه A، کاربنی سیلیناز است که کاربنی سیلین ها را بیشتر از پنی سیلیناز غیر فعال می کند، و کمی تأثیر برروی کلواگراسیلین ها می گذارند. گروه ۲d، از گروه A، کلواگراسیلیناز است که کلواگراسیلین ها را بیشتر از بنزیل پنی سیلین ها غیر فعال می کند، و کمی برروی کاربنی سیلین ها اثر می گذارد. این انزیم ها، به طور ضعیف توسط کلاوولانیک اسید مهار می شود و بعضی از آن ها به عنوان ESBLs مطرح است، به طور صحیح، اگراسیلیناز است.

^{۲۲۱} Cefpodoxime

^{۲۱۹} TEMoniera
^{۲۲۰} Sulphydril Variable

این انزیم ها، اگر از لویل پنی سیلین هایی مثل کلوزاسیلین ها، دی کلوزاسیلین ها را غیر فعال می کند. انزیم ها، متعلق به کلاس مولکولی D است. گروه ۲e، از کلاس A، سفالوسپوریناز است، که می تواند مونوباکتام ها را هیدرولیز می کند و توسط کلاوولانیک اسید مهار می شوند.

گروه ۲f، از کلاس A، کارباپنماز است. این گروه بر خلاف کارباپنماز ها که حاوی روی هستند، حاوی سرین هستند. کارباپنماز های کلبسیلا پنومونیه (KPC)، متعلق به کلاس A کارباپنماز است و به وسیله پلازمید ها منتقل می شود و توسط تمامی پنی سیلین ها، سفالوسپورین ها و کارباپنم ها هیدرولیز می شود (۱۱۹، ۱۲۶). گروه ۳ بتالاکتاماز ها، متالوانزیم است که حاوی روی یا متالوبتالاکتاماز است. این گروه حاوی یون آهن، روی است. متالوبتالاکتاماز ها، توانایی هیدرولیز پنی سیلین ها، سفالوسپورین ها و کارباپنم ها را دارند. بنابراین کارباپنم ها توسط هردو گروه ۲f، ۳ هیدرولیز می شوند (۱۲۶).

کلاس B: متالوبتالاکتاماز های حاوی یک یا دو یون روی (Zn) در جایگاه فعال خود می باشند. مثل: IMP^{۲۲۲}، AIM^{۲۲۳}، GIM^{۲۲۴}، SPM^{۲۲۵}، VIM^{۲۲۶}، NDM، که شامل زیر کلاس هایی مثل: B1 تا B3 می باشد. متالوبتالاکتاماز ها، طیف وسیعی از پنی سیلین ها، سفالوسپورین ها، و کارباپنم ها را به واسطه شکستن پیوند آمیدی در حلقه بتالاکتام، هیدرولیز می کند. IMP متعلق به زیر کلاس B1 است. کلاس D شامل: کارباپنماز های OXA^{۲۲۷} مثل: OXA-23 و OXA-48، OXA-198 کارباپنماز ها به واسطه هیدرولیز توسط بتالاکتام ها، و مقاومت به مهار کننده های معمول بتالاکتاماز، شناسایی می شوند (۱۱۹، ۱۲۳، ۱۲۷-۱۳۵).

گروهی از متالوبتالاکتاماز ها که منشاء کروموزومی دارند، در باکتری های محیطی و یا پاتوژن های فرصت طلب، مانند BcII در باسیلوس سرئوس^{۲۲۸}، GOB₁ در الیزابت کینگیا میننگوسپتیکا^{۲۲۹} و L1 در استنوتروفوموناس مالتوفیلیا^{۲۳۰} وجود دارد، هر چند اکثر آن ها مثل VIM، در قالب عناصر ژنتیکی متحرک منتقل می شوند (۱۳۶). گروه ۴، پنی سیلیناز هایی هستند که توسط کلاوولانیک اسید مهار نمی شوند (۱۲۶) چندین مطالعه نشان داده است که، ارگانیزم هایی که متالوبتالاکتاماز ها را حمل می کنند، ممکن است در شرایط آزمایشگاهی^{۲۳۱} به کارباپنم ها

Oxacillinase^{۲۲۷}
Bacillus cereus^{۲۲۸}
Elizabetha meningoseptica^{۲۲۹}
Stenotrophomonas maltophilia^{۲۳۰}
In Vitro^{۲۳۱}

Imipenemase^{۲۲۲}
Austeralian Imipenemase^{۲۲۳}
Germany Imipenemase^{۲۲۴}
Sao Paulo Metallo β lactamase^{۲۲۵}
Verano Imipenamse^{۲۲۶}

حساس باشند، ولی در شرایط بیولوژیک^{۲۳۲} مقاوم باشند (۱۳۷، ۱۳۸). باکتری های تولید کننده NDM به طور معمول به همه گروه های آنتی بیوتیکی شامل: فلوروکینولون ها، آمینوگلیکوزید ها و بتا لاکتام ها به خصوص کارباپنم ها مقاوم است اما به کلیستین و بعضی اوقات به تیگسیکلین^{۲۳۳} حساس است (۱۳۹). برخلاف موفقیت هایی که در پیشرفت مهار کننده های بتالاکتاماز برای درمان ترکیبی ایجاد شده است، استفاده از مهار کننده های بتالاکتاماز به واسطه میل ترکیبی متنوع بتالاکتاماز ها و مقادیر متنوعی از بتالاکتامازها که در باکتری های گوناگون تولید می شود، هنوز بحث برانگیز است (۱۴۰). متالوبتالاکتاماز ها توسط مهار کننده های بتالاکتامازی مهار نمی شوند. بلکه توسط شلاته کننده های فلزی از قبیل اتیلن دی امین تترا استیک اسید (EDTA)^{۲۳۴} و گروه تیول^{۲۳۵} مهار می شوند (121, 122) کلاس C: که از آن ها می توان به AmpC بتالاکتاماز ها اشاره کرد. این کلاس از بتالاکتامازها، توانایی هیدرولیز سفالوسپورین ها و سفومايسين^{۲۳۶} ها را دارد. کلاس D: بتالاکتاماز هایی با قدرت هیدرولیز فراوان مانند OXA بر علیه کلواگزاسیلین ها و اگزاسیلین ها هستند (۱۲۱، ۱۲۲) تولید بتالاکتاماز، یکی از مکانیسم های مقاومت اصلی در برابر آنتی بیوتیک های بتالاکتام است (141).

Thiol^{۲۳۵}
Cefomycin^{۲۳۶}

in Vivo^{۲۳۲}
Tigecycline^{۲۳۳}
Ethylen diamine tetra acetic acid^{۲۳۴}

جدول ۱-۲ = طبقه بندی خانواده بتالاکتاماز (۱۴).

Bush & Jacob System group	Ambler System group	Enzyme type	Inhibition Clavulanate	Main attributes
1	C	cephalosporinase	No	Chromosomal
2a	A	penicillinase	YES	Staphylococcal Penicillinase
2b	A	broad-spectrum	YES	TEM-1,2 SHV-1
2be	A	extended-spectrum	YES	TEM & SHV variant
2br	A	inhibitor resistant	Diminished	Inhibitor resistant TEM
2c	A	Carbenicillinase	YES	Carbenicillin Hydrolyzing
2d	D	Cloxacillinase	YES	Oxacillin Hydrolyzing
2e	A	cephalosporinase	YES	Cephalosporinase
2f	A	carbapenemase	YES	IMP
3a,3b,3c	B	Metallo enzyme	NO	extended carbapenemase (NDM)
4	A	Penicillinase	NO	Misc enzymes
IMP: imipenem, SHV:Sulhydryl Variable, TEM: TEMoniera				

در بررسی که توسط ECDC در سال ۲۰۱۵ در ۳۸ کشور اروپایی بر روی مقاومت آنتی بیوتیکی در انتروباکتریاسه ها انجام شده بود. در ۱۳ کشور (۳۴/۲۱٪)، انتروباکتریاسه مولد کارباینماز شناسایی شد، این در حالی است که در سال ۲۰۱۳ تنها در ۶ کشور (۱۵/۷۸٪) انتروباکتریاسه مولد کارباینماز شناسایی شد (۱۴۲).

۱-۱۰-۲-۳-۲: مهار کننده های بتالاکتامازی

در سال ۱۹۸۰، آموکسی سیلین-کلاوولانیک اسید معرفی شد. این دارو، حاوی یک بتالاکتام (آمپی سیلین) و مهار کننده بتا لاکتامازی (کلاوولانیک اسید) است و در درمان عفونت های ناشی از باکتری های مقاوم به ESBL مورد استفاده قرار می گیرد.

۱-۱۰-۲-۳-۳: متالوبتالاکتاماز

طبقه بندی متالوبتالاکتاماز ها براساس توانایی آن ها در هیدرولیز کارباینم ها و مهار آن ها به وسیله EDTA که حاوی روی است، انجام می شود (۱۲۳). کلاس B متالوبتالاکتاماز ها، طیف سوبسترا گسترده ای دارد و می تواند آنتی بیوتیک های بتالاکتام را به استثناء مونوباکتام هیدرولیز کند. این دسته از بتالاکتامازها، به وسیله کلاوولانیک اسید، سولباکتام و یا تازوباکتام که در برابر کلاس A بتالاکتاماز اثر می گذارند، مهار نمی شوند (۱۴۳، ۱۴۴). به طور کلی ۵ نوع متالو بتالاکتاماز توصیف شده است: (۱) ایمی پنماز (*blaIMP*) (۲) متالو بتالاکتاماز کد شونده اینتگرون ورونا (*blaVIM*)، سائو پائولو متالو (*blaSPM*)، ایمی پنماز آلمانی (*blaGIM*)، سئول ایمی پنماز^{۲۳۷} (*blaSIM*) (۱۴۵)، متالو بتالاکتاماز کریزنوباکتریوم ایندولونز^{۲۳۸} (*blaIND*) (۱۴۶) متالوبتالاکتاماز استنوتروفوموناس مالتوفیلیا (*blaL1*) (۱۴۷). ایمی پنماز بیمارستان دانشگاه کیورین^{۲۳۹} (*blaKHM*)، ایمی پنماز استرالیایی (*blaAIM*) متالوبتالاکتاماز باسیلوس سرئوس (*blaBcII*) (۱۰۰)، متالوبتالاکتاماز جدید دهلی نو (*blaNDM*) (۳۱).

^{۲۳۹} Kyorene university of Hospital

^{۲۳۷} Seoul Imipenemase
^{۲۳۸} *Cheryseobacterium indologene*

VIM و IMP و NDM، از شایعترین ژنوتیپ های متالوبتالاکتاماز هستند، که از این میان *bla*_{IMP} و *bla*_{VIM} به صورت اینتگرون هایی با منشاء کروموزومی و یا پلازمیدی دیده شده است. در سال ۲۰۰۹، سویه های NDM مثبت، تقریباً در سراسر قاره ها به جزء نواحی قطب جنوب گزارش شد (۱۳۶، ۱۴۸).

IMP:

انزیم IMP از زیر کلاس B₁ می باشد که دارای یون فلزی روی در جایگاه فعال انزیم است. IMP پلازمیدی در سال ۱۹۸۰ از سویه *Pseudomonas aeruginosa* GN₁₇₂₀₃ در ژاپن گزارش شد. ال مقاومتی بر روی پلازمید کونژوگه ای قابل انتقال قرار گرفته که توانایی انتقال به همه سویه های پseudomonas را دارد. در سال ۱۹۹۱ ژن مشابهی از سویه Tn₉₁₀₆ سریشیا مارسنس در اوکازاکی ژاپن شناسایی شد و به عنوان IMP-1 شناخته شد این انزیم پروتئینی با ۲۴۶ آمینو اسید و وزن مولکولی ۳۰ کیلودالتون (۳۰ KD) است که بر روی پلازمید بزرگی (۱۲۰ kb) در داخل اینتگرون کلاس III قرار دارد. باکتری هایی مثل کلبسیلا پنومونیه، سیتروباکتر فروندی، اشیریشیا کلی، سویه های اسنیتو باکتر و آکالیژنز گیزیلوآکسیدانس مولد IMP-1 هستند (۱۴۹، ۱۵۰).

NDM:

باکتری های مولد NDM، به طور معمول به داروهای بتالاکتام (به ویژه کاربنم ها)، آمینوگلیکوزید ها، فلوروکینولون ها مقاوم هستند (۱۳۹). NDM-1، انزیم جدیدی است که باکتری ها را در برابر بسیاری از آنتی بیوتیک ها مقاوم می کند. به همین علت، به عنوان یک عامل تهدید کننده و مشکل جهانی، موجب نگرانی های شدید در بیمارستان ها شده است. نام دیگر این انزیم (Plasmid Encoding Carbapenem Resistant Metallo Beta-lactamase) یا PCM است (۱۵۱). NDM-1، یک مثالی از متالوبتالاکتامازهای قوی است که برای اولین بار در سال ۲۰۰۸ در کلبسیلا پنومونیه و اشیریشیا کلی و در یک بیمار سوئدی که از هند برگشته بود، کشف شد. NDM-1 به صورت قابل ملاحظه ای در سویه های انتروباکتریاسه در هند شناسایی شد و سپس در جهان پخش شد (۱۵۲). ژن *bla*_{NDM-1} در چندین نوع پلازمید از جمله IncA/C, IncF, IncL/M یافت شده است و می تواند از طریق کونژوگاسیون در میان باکتری های گرم منفی منتقل شود. هرچند برخلاف ژن های کد کننده ی

IMP, VIM, ژن bla_{NDM-1} در ساختار اینتگرون یافت نشده است ولی به سرعت منتشر شده است (۱۵۳). این انزیم در سال ۲۰۰۹ در دهلی نو گزارش شد. این ژن گسترش وسیعی در اشریشیا کلی و کلبسیلا پنومونیه در هند و پاکستان دارد. در اواسط ۲۰۱۰ باکتری های حامل NDM-1 به کشورهای دیگر نیز گسترش یافته است مانند ایالات متحده آمریکا، که به احتمال زیاد، این انتقال توسط مسافران گردشگری صورت گرفته است. ژن کد کننده NDM-1 بر روی پلازمیدهای متحرک قرار دارد. این پلازمید در کلبسیلا پنومونیه نیز مشاهده شده است و قادر است به سوبه های باکتریایی متفاوت دیگر نیز منتقل شود و باعث انتشار مقاومت دارویی نیز در سراسر دنیا شود (۱۵۴).

NDM-2، که در اسنیتوباکتر بومانی جدا شده از مصر و اسرائیل آلمان و امارات عربی دیده شده است (۱۵۵، ۱۵۶). NDM-4، که در اشریشیا کلی جدا شده از هند دیده شده است (۱۵۷). NDM-5 که در اشریشیا کلی جدا شده از انگلستان دیده شده است (۱۵۸). NDM-6 که در اشریشیا کلی جدا شده از نیوزلند دیده شده است (۱۵۹). در انتروباکتریاسه، ژن bla_{NDM-1} توسط ۳ نوع پلازمید به نام های IncA/C, IncF, INC L/M یا غیر قابل تیپ بندی حمل می شود (۳۱، ۱۶۰، ۱۶۱). از طرفی انزیم NDM-2، که در اسنیتوباکتر بومانی جدا شده از مصر و اسرائیل، دیده شده است (۱۵۵، ۱۵۶). به واسطه جایگزینی یک آمینواسید (پرولین ۲۸ آلانین) قرار گرفته در پپتید رهبر انزیم، که خصوصیات هیدرولیتیکی آن در مقایسه با انزیم NDM-1 تغییر نکرده است، از انزیم NDM-1 متفاوت است (۱۵۵، ۱۶۲).

VIM:

بتالاکتاماز نوع VIM اولین بار در سوبه های با مقاومت چندگانه پseudomonas آئروژینوزا در سال ۱۹۹۰ در ایتالیا و سپس در سراسر جهان گزارش شد (۱۶۳). این انزیم دومین خانواده از MBL ها است و از زیر کلاس B₁ و دارای وزن مولکولی ۲۵ کیلودالتون می باشد. این انزیم در حدود ۴۱ واریانت دارد که بیشتر در pseudomonas آئروژینوزا دیده شده است اما در انتروباکتریاسه نیز دیده شده است این انزیم انتشار و گسترش وسیعی در اروپا، آمریکای جنوبی، شرق دور و ایالت متحده دارد. bla_{VIM} توسط یک پلازمید غیر کونژوگه ای ۳۰ کیلودالتونی در اینتگرون کلاس ۱ حمل می شود. VIM در کشورهای دیگر اروپایی و ترکیه نیز گزارش شده است (۱۴۹).

KPC:

یک کلاس جدید از انزیم هایی که توانایی غیرفعال کردن کاربپنم ها را دارد، کاربپنماز کلبسیلا پنومونیه (KPC)، نام دارد، که به سرعت در ایالات متحده آمریکا و دیگر نقاط دنیا گسترش یافت (۱۶۴)

شایع ترین کاربپنماز در میان انتروباکتریاسه ها در کشور آمریکا، کاربپنماز کلبسیلا پنومونیه (KPC) است که متعلق به کلاس A آمبلر است (۱۶۵، ۱۶۶). انزیمی که در جهان نیز گسترش یافت. کلبسیلا پنومونیه، شایع ترین ارگانیسمی است که با مقاومت ناشی از KPC مرتبط است. با این حال KPC ها به طور قابل توجهی در دیگر جنس های خانواده ی انتروباکتریاسه مانند: اشیشیا، پروتئوس، سراشیا، سالمونلا و سیتروباکتر دیده شده اند. این انزیم توسط پلازمید های قابل انتقال (ترنسپوزون Tn₄₄₀₁ پلازمیدی که باعث انتشار سریع این انزیم می شود) منتقل می شود و می تواند همه پنی سیلین ها، سفالوسپورین ها، آزترونام و کاربپنم ها را هیدرولیز کند. ژن KPC برای اولین بار در ایزوله های شمال کارولینا شناسایی شد و به نام KPC-1 نام گذاری شد. بعد ها انواع دیگر این انزیم از KPC-2 تا KPC-11، نام گذاری شد. انزیم های KPC در خصوصیات کینتیک خود و قدرت هیدرولیز با یکدیگر متفاوت اند برای مثال: KPC-2 به عنوان یک کاربپنماز منحصر به فرد، در اثر مهار کننده های بتالاکتامازی مانند کلاولانیک اسید مقاومت از خود نشان می دهد و یا KPC-3، فعالیت هیدرولیز کنندگی بالایی در برابر سفتازیدیم (به طور تقریبی ۳۰ برابر بیشتر از KPC-2 دارد). در میان انواع KPC، KPC-2 و KPC-3 شیوع بالاتری در نمونه های کلینیکی دارد (123, 164, 167, 168)

OXA-48:

بتالاکتامازهای OXA، جزء اولین بتالاکتامازهایی است که کشف شد. این کلاس از بتالاکتامازهای گروه D به صورت نسبی نادر اند و همیشه با واسطه پلازمید منتقل می شوند. این دسته از بتالاکتامازها (گروه D)، پنی سیلینازهای ضروری اند، که برخلاف بتالاکتامازهای کلاس A، می توانند آن ها را هیدرولیز کنند و مقاومت به اگزاسیلین ها

را همانند پنی سیلین ها ایجاد کند که به این خاطر، به آن ها اگزاسیلیناز می گویند و به صورت OXA نوشته می شوند. آنها فعالیت محدودی بر علیه پنی سیلین ها دارند، اما بعضی از آنها، توانایی عرضه مقاومت به سفالوسپورین ها را دارند. از سال ۱۹۸۰ تا الان، ایزوله های اسنیتوباکتر بومانی که مقاوم به کارباپنم بودند بتالاکتامازهای کد شده پلازمیدی (OXA-23, OXA-40, OXA-58) را نشان داده اند، که در طبقه بندی انزیم های OXA قرار دارد، زیرا که توالی آن ها، شبیه به بتالاکتامازهای OXA اولیه است (۱۶۹).

:AIM

AIM-1 اولین عضو از زیر گروه جدید MBL ها را تشکیل می دهد، این انزیم از یک زن بومی استرالیا با نقص سیستم ایمنی که دچار عفونت با پسودوموناس آئروژینوزا شده بود، ایزوله شده است. AIM دارای ژنوم ۹۱۵bp می باشد که کد کننده یک پروتئین ۳۰۵ آمینو اسیدی است. این انزیم از زیر کلاس B₃ است و نسبت به دیگر انزیم ها مثل GIM, SIM, VIM, IMP کمتر شناخته شده است. حضور ISCR₁₀ در مجاورت *bla*_{AIM} مانند SPM، در انتقال این ژن مؤثر است (170).

:GIM

در سال ۲۰۰۲، در آلمان پنج سویه پسودوموناس آئروژینوزا از بیماران مختلف ایزوله شد که حاوی کلاس جدیدی از بتالاکتامازها تحت عنوان GIM بودند، این ایزوله ها فقط به پلی میکسین حساس بودند. ژن *GIM*(*bla*_{GIM-1})، فقط در تعداد کمی از ایزوله های انتروباکتر کلوآسه، سراشیا مارسنس، اسنیتوباکتر پیتی و پسودوموناس آئروژینوزا دیده شده است. توالی آمینو اسیدی *GIM-1* شباهت زیادی به *IMP-1* (۴۳/۱ درصد)، *IMP-4* (۴۳/۱ درصد) و *IMP-6* (۴۳/۵ درصد)، از خانواده *VIM-7:VIM* (۳۱/۲ درصد)، *VIM-1* (۲۸/۸ درصد)، *VIM-4* (۲۸/۸ درصد)، *VIM-5* (۲۸/۸ درصد) و *SPM* (۲۸ درصد) دارد. مانند اکثر ژن های MBL، *bla*_{GIM-1} بر روی کلاس ۱ اینتگرون (ln77) قرار داشته و توسط پلازمید غیر قابل انتقال کوچک (۲۲kb) حمل می شود (۱۴۹، ۱۷۱-۱۷۵).

:SPM

انزیم SPM از Sao Paulo برزیل در سال ۱۹۹۷، ایزوله شده است. این انزیم از زیر کلاس B₁ بوده و نسبت به دیگر انزیم های MBLs بیشترین شباهت را به IMP دارد. توالی SPM به علت وجود یک قطعه ۲۴ آمینو اسیدی

در جایگاهی بعد از سایت فعال انزیم، کاملاً متفاوت از توالی IMP و VIM بوده و این قطعه به عنوان loop عمل کرده، باعث تقویت اتصال این انزیم به بتالاکتام ها شده و منجر به هیدرولیز آن ها می شود. bla_{SPM} محتوی ژنتیکی منحصر به فردی دارد SPM با اینتگرون و ترنسپوزون ها در ارتباط نبوده، بلکه حضور $ISCR_{10}$ در مجاورت این ژن است که در حرکت و انتقال آن، دخیل می باشد. SPM مانند IMP و VIM قدرت هیدرولیز کلاوولانیک اسید و آرترون نام را ندارد. سوبسترای SPM پنی سیلین هایی مانند: پنی سیلین، آمپی سیلین، پمپراسیلین، کاربنی سیلین و سفالوتین است (۱۴۹).

SIM :

این انزیم از سویه اسنیتوباکتر بومانی جدا گشته است و از زیر کلاس B_1 می باشد. SIM، شباهت زیادی به IMP (۶۹ درصد به IMP_{12} و ۶۴ درصد به IMP_9) دارد. این انزیم، توانایی هیدرولیز طیف وسیعی از بتالاکتام ها مانند پنی سیلین، به طور محدودی سفالوسپورین های وسیع الطیف و کارباپنماز ها دارد. ژن bla_{SIM} بر روی اینتگرون کلاس ۱ واقع شده است (۱۷۰).

۱-۱: درمان

کارباپنم ها به طور معمول به عنوان داروی انتخابی در درمان عفونت های ناشی از باسیل های گرم منفی مقاوم به سفالوسپورین های با طیف وسیع به کار می روند. در سالهای اخیر به سبب مصرف گسترده کارباپنم ها به ویژه در درمان ارگانیسم های تولید کننده بتالاکتامازهای وسیع الطیف (ESBLs) و بتالاکتامازهای Amp^C ، شاهد افزایش مقاومت دارویی به ویژه مقاومت ناشی از کارباپنماز در برابر این دسته از آنتی بیوتیک ها هستیم و افزایش بروز مقاومت آنتی بیوتیکی در خانواده انتروباکتریاسه، نگرانی شدیدی را در درمان این گروه از باکتری ها ایجاد کرده است (۱۵۲).

بر طبق مطالعات کلینیکی که انجام شده است. استفاده از درمان های ترکیبی بر پایه کلیستین، به عنوان یک روش استاندارد برای درمان عفونت های ناشی از گرم منفی های مولد کارباپنماز مفید می باشد (۱۷۶-۱۷۹). این درمان ترکیبی شامل: کلیستین به همراه آنتی بیوتیکی که باکتری به آن مقاوم است (برای مثال: کارباپنم)، در ضمن، این نوع درمان آنتی بیوتیکی، از درمان تک دارویی کلیستین به مراتب بهتر است (۱۸۰).

فصل دوم

بررسی متون

۲-۱: بررسی متون

- ❖ در مطالعه ای که توسط فرشته شاهچراغی و همکاران در بین سال های ۲۰۰۹ تا ۲۰۱۱ در تهران انجام شد. از بین ۲۴۴ ایزوله اشريشيا کلي ۹ ايزوله (۳/۸۶٪) به مروپنم، ۱ ايزوله (۰/۴٪) به ايمي پنم، ۲ ايزوله (۰/۸٪) به ارتاپنم مقاوم بودند (۱۸۱).
- ❖ در مطالعه ای که توسط سارا عبدالهی خیر آبادی و همکاران در سال ۱۳۹۰ در شهرستان فسا بر روی ۲۳۴ ايزوله اشريشيا کلي انجام شد، ۲۶ ايزوله (۱۱/۱٪) به ايمي پنم مقاوم بودند (۱۸۲).
- ❖ در مطالعه ای که در سال ۱۳۹۲ توسط سيد سعيد عقيل زاده و همکاران در تبریز بر روی ۱۰۰ ايزوله اشريشيا کلي انجام شد، ۳ ايزوله (۳٪) به ايمي پنم، ۳ ايزوله (۳٪) به ارتاپنم، ۴ ايزوله (۴٪) به مروپنم مقاوم بودند (۱۸۳).
- ❖ در مطالعه ای که توسط پریسا ولی و همکاران در بین سال های ۲۰۱۱ تا ۲۰۱۲ در تهران انجام شد، از بین ۵۵ ايزوله مورد مطالعه، ۴ ايزوله اشريشيا کلي بود و از این میان هیچ یک از ايزوله های اشريشيا کلي حاوی *bla_{IMP}* و *bla_{VIM-1}* و *bla_{VIM-2}* نبودند (۱۸۴).
- ❖ در یک مطالعه که در بیمارستان رویال عمان، توسط دورت و همکاران در بین اکتبر ۲۰۱۰ تا مارچ ۲۰۱۱ انجام شد، از ۲۲ ايزوله انتروباکتریاسه با مقاومت چندگانه، ۴ ايزوله اشريشيا کلي بود، و از این میان، تنها یک ايزوله (۲۵٪) حاوی ژن *bla_{NDM-1}* بود (۱۸۵).
- ❖ در یک بررسی که توسط بهاسکار مانازا و همکارانش در بین سال های ۲۰۱۰ تا ۲۰۱۲ در جنوب هند انجام شد، از میان ۹۳ ايزوله جدا شده از بیمارستان ها (۵۹ ايزوله کلبسیلا، ۸ ايزوله اشريشيا کلي و ۲۶ ايزوله انتروباکتر)، ۶۶ ايزوله (۷۰/۶ درصد) حاوی ژن *bla_{NDM-1}* بودند. این در حالی است که از ۸ ايزوله اشريشيا کلي ۶ ايزوله (۷۵ درصد) حاوی ژن *bla_{NDM-1}* بودند (۱۸۶).
- ❖ در یک مطالعه که توسط لینگ ما و همکارانش، در سال های ۲۰۱۰ و ۲۰۱۲ در مؤسسه ملی تحقیقات در تایوان انجام شد، در سال ۲۰۱۰ از ۸ بیمارستان، ۳۲ ايزوله اشريشيا کلي غیر حساس و یا حساس به

مروپنم بودند، همچنین در سال ۲۰۱۲ از ۱۷ بیمارستان (۴۳ ایزوله اشريشيا کلی)، جدا شد. در سال های ۲۰۱۰ تا ۲۰۱۲، همه ایزوله های اشريشيا کلی، به ارتاپنم مقاوم بودند (۱۸۷).

❖ در یک مطالعه در سال ۲۰۱۰، ۴۴ ایزوله NDM-1 در چنای، ۲۶ ایزوله در هاریانا، ۳۷ ایزوله در انگلستان و ۷۳ ایزوله در نقاط مختلف هند و پاکستان شناسایی شد. در مطالعه ای که در بین سال های ۲۰۰۶ تا ۲۰۰۷ در ۳۹ ایزوله انتروباکتریسه مقاوم به کارباپنم انجام شده بود. تقریباً ۱۵٪ حاوی bla_{NDM-1} شناسایی شدند (۳۱).

❖ در یک مطالعه که توسط Tawfik Abd Motaleb (تاوفیک عبدالمطلب) در سالهای ۲۰۱۱ تا ۲۰۱۲ بر روی ۱۰۵ ایزوله حاوی متالوبتالاکتاماز جدا شده از ICU بیمارستان آموزشی این شمس انجام شد. ۱۱ ایزوله مربوط به اشريشيا کلای بود که: ۵ ایزوله (۴/۴۵٪) حاوی bla_{IMP} ، ۳ ایزوله (۲/۲۷٪) حاوی bla_{VIM} ، ۲ ایزوله (۱/۱۸٪) حاوی bla_{SIM} ، ۱ ایزوله (۹/۰۹٪) حاوی bla_{GIM} بودند. ولی هیچ ایزوله ای حاوی bla_{SPM} شناسایی نشد (۱۸۸).

❖ در یک مطالعه که توسط رحمان موهیبور و همکارانش، در سال ۲۰۱۲ در مؤسسه علوم پزشکی سانجای گاندهی هند انجام شد، از میان ۳۲ ایزوله اشريشيا کلی، ۱۴ ایزوله (۵/۴۳ درصد) حاوی ژن bla_{NDM-1} بود (۱۸۹).

❖ در مطالعه ای که توسط گیسله پیرانو (Gisele peirano) و همکارانش در بین سال های ۲۰۰۸ تا ۲۰۱۳ بر روی ۴۰۷ نمونه اشريشيا کلای ST 131 انجام شده بود، در ۱۱۶ ایزوله اشريشيا کلای، حضور bla_{NDM} ، bla_{VIM} ، bla_{IMP} مثبت اعلام شد، که از این میان ۴۴ نمونه (۳۸٪) ژن bla_{NDM} ، ۲ نمونه (۲٪) ژن bla_{VIM-1} و ۲ نمونه (۱٪) حاوی ژن bla_{IMP} اعلام شدند و بقیه حاوی ژن های دیگر بودند (۱۹۰).

فصل سوم

مواد و روش ها

۳-۱: اهداف و فرضیات

۳-۱-۱: هدف اصلی:

تعیین فراوانی ژن های bla_{NDM-1} , bla_{IMP} , bla_{AIM} در سویه های بالینی اشریشیا کلی مقاوم به کاربایتم جدا شده از بخش های مراقبت های ویژه بیمارستان های قزوین، تهران و کرج.

۳-۱-۲: اهداف فرعی:

۱- تعیین حساسیت دارویی نسبت به آنتی بیوتیک های مختلف و کاربایتم ها (ایمی پنم، مروپنم و ارتاپنم) با استفاده از روش دیسک دیفیوژن مطابق با روش استاندارد CLSI^{۲۴۰}.

۲- فراوانی ایزوله های اشریشیا کلی مقاوم به کاربایتم جدا شده از بخش مراقبت های ویژه بیمارستان های مورد مطالعه

۳- غربالگری فنوتیپی کاربایتماز ها در سویه های اشریشیا کلی جدا شده از بخش مراقبت های ویژه بیمارستان های

آموزشی قزوین، کرج، تهران با استفاده از روش MHT (Modified Hodge Test) بر اساس روش استاندارد

CLSI.

۴- تعیین تولید متالوبتالاکتاماز به روش دیسک ترکیبی با استفاده از دیسک مروپنم و واتیلن دی آمین تترا استیک

اسید (EDTA).

۵- تعیین فراوانی ژن های bla_{IMP} , bla_{NDM-1} , bla_{AIM} در ایزوله های اشریشیا کلی جدا شده از بخش مراقبت های

ویژه بیمارستان های آموزشی قزوین و کرج و تهران به تفکیک بیمارستان ها و شهر ها

۶- مقایسه نتایج فنوتیپیک با نتایج ژنوتیپیک

۳-۱-۳: اهداف کاربردی

نظر به اینکه کاربایتم ها از داروهای اصلی انتخابی در درمان اشریشیا کلی های با مقاومت چندگانه می باشند و با

توجه به شرایط بحرانی بیماران بستری در ICU و با در نظر گرفتن این نکته که این بیماران دارای عوامل خطر

زیادی برای ابتلا به عفونت با ایزوله های مقاوم در گردش در ICU می باشند، لذا اهمیت شناسایی مکانیسم های

عمده دخیل در بروز مقاومت دارویی به ویژه الگوهای مقاومتی اکتسابی از جمله کارباینها به ویژه متالوبتالاکتامازها حائز اهمیت می باشد.

همچنین با توجه به ماهیت سیار عناصر انتقال دهنده این نوع مقاومت و با در نظر گرفتن اینکه ارگانسیم های حاوی این انزیم ها الگوهای مقاومت دارویی گسترده را نشان می دهند لذا نتایج این مطالعه ضمن نیل به اهداف اپیدمیولوژیک می تواند در اتخاذ تصمیمات پیشگیرانه در جلوگیری از انتشار اینگونه سویه ها و انتخاب پروتکل درمانی مناسب مورد استفاده قرار بگیرد .

۳-۱-۴: فرضیات یا سوال های پژوهش

۱- حساسیت دارویی نسبت به آنتی بیوتیک های مختلف و کارباینها (ایمی پنم ، مروپنم و ارتاپنم) با استفاده از روش دیسک دیفیوژن مطابق با روش استاندارد CLSI چگونه است؟

۲- فراوانی ایزوله های اشیریشیا کلی مقاوم به کارباینها جدا شده از بخش مراقبت های ویژه بیمارستان های مورد مطالعه چگونه است؟

۳- غربالگری فنوتیپی کارباینها در سویه های اشیریشیا کلی جدا شده از بخش مراقبت های ویژه بیمارستان های آموزشی قزوین و کرج و تهران با استفاده از روش MHT با روش استاندارد CLSI چگونه است؟

۴- تولید متالوبتالاکتامازها به روش فنوتیپی دیسک ترکیبی (CD test) با استفاده از دیسک مرو پنم و فیل برونیک اسید و EDTA چگونه است؟

۵- فراوانی ژنهای bla_{IMP} , bla_{NDM-1} , bla_{AIM} در اشیریشیا کلی جدا شده از بخش مراقبت های ویژه بیمارستان های مورد مطالعه چگونه است؟

مواد و روش ها:

۳-۲-۱: نوع مطالعه

توصیفی-مقطعی بوده

- معیار ورود به مطالعه شامل: نمونه های ارسالی که از نظر رشد گونه های اشیریشیا کلی مثبت باشد.

- معیار خروج از مطالعه شامل: حذف نمونه های ارسالی به آزمایشگاه که از لحاظ وجود اشیریشیا کلی منفی باشند.

۲-۲-۳: جامعه مورد مطالعه و روش نمونه گیری

بر اساس پارامترهای آماری تعیین حجم نمونه، تعداد نمونه های این مطالعه ۲۶۷ نمونه می باشد. که از هر

بیمارستان بصورت تصادفی انتخاب می شود. این عدد با توجه به شیوع ۵۰ درصدی ژن های bla_{NDM-1}, bla_{AIM}

bla_{IMP} ، و ضریب اطمینان ۰/۹۵ و دقت ۰/۰۵ حجم نمونه از رابطه زیر بدست می آید

$$n = \frac{Z^2_{1-\alpha/2} \times P \times (1 - P)}{d^2} = \frac{3/84 \times 0/05 \times 0/5}{0/0025} = 267$$

جدول ۱-۳= متغیرهای این مطالعه

عنوان متغیر	مستقل	وابسته	کمی		کیفی		تعریف علمی	مقیاس
نمونه بالینی	✓		پیوسته	گسسته	اسمی	رتبه	نمونه های	نوع نمونه
					✓		بالینی جدا شده از بیماران مورد مطالعه	
بخش بستری	✓				✓		بخش های بستری در بیمارستان	نوع بخش
بیمارستان	✓							
مقاومت به آنتی بیوتیک ها		✓			✓		بر اساس نتایج دیسک دیفیوژن	میلی متر (حساس مقاوم نیمه حساس)
ژن های مقاومت <i>bla</i> NDM-1 <i>bla</i> AIM <i>bla</i> IMP	✓				✓		بر اساس نتایج PCR پرایمرهای مورد مطالعه	وجود دارد ندارد

۳-۳: جمع آوری نمونه:

تعداد ۲۶۷ ایزوله اشیریشیا کلی، در یک دوره زمانی یک ساله، از سال ۱۳۹۳ تا ۱۳۹۴، از بیماران بستری در بخش های مراقبت ویژه از بیمارستان های شهرهای تهران، قزوین و کرج جمع آوری کردیم.

۳-۴: آزمایش تعیین هویت ایزوله ها به روش فنوتیپی

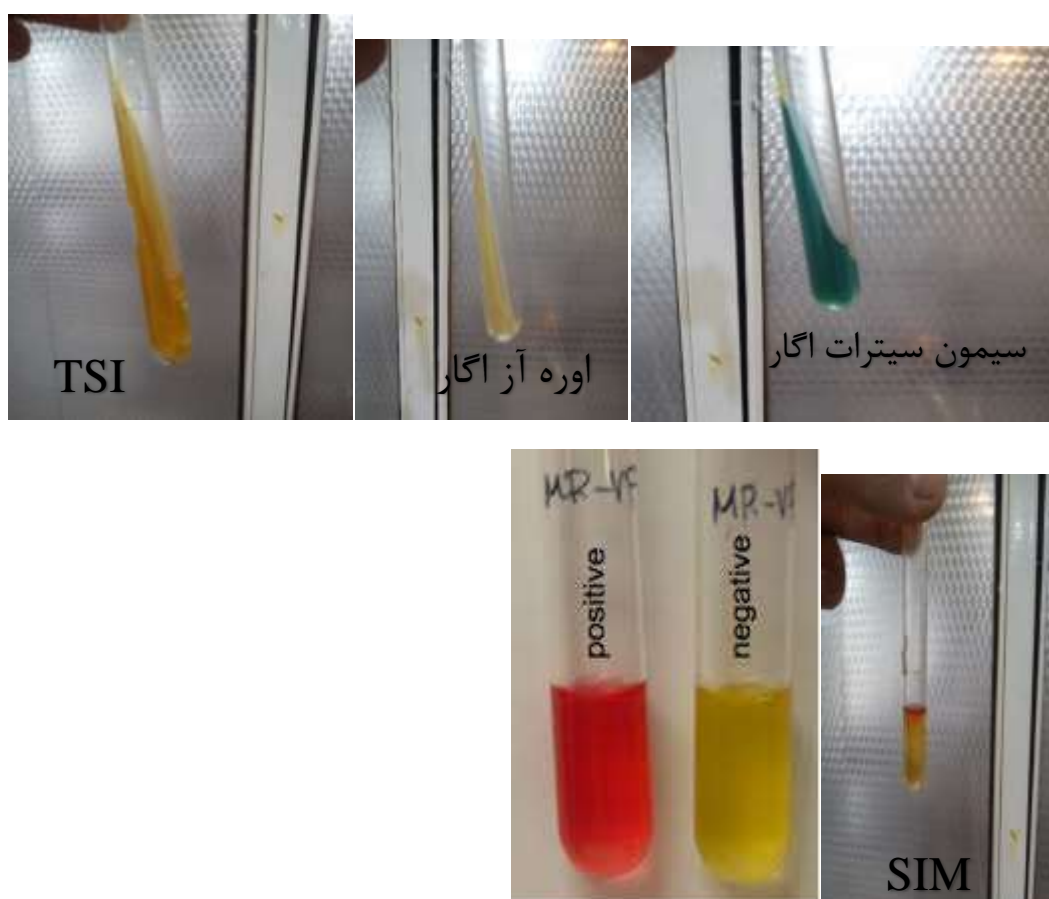
نمونه های ادرار در آزمایشگاه های بیمارستان ها بر روی دو محیط پایه بلاد آگار و مک کانکی آگار کشت داده شده و پس از ۴۸ ساعت انکوباسیون در دمای ۳۵ درجه سانتی گراد، توسط آزمایش های بیوشیمیایی توصیه شده توسط کتاب میکروب شناسی تشخیصی BAILEY & SCOTT مربوط به شناسایی گونه اشیریشیا کلی مورد بررسی قرار گرفته و تعیین هویت شدند.

در رنگ آمیزی گرم و بررسی های میکروسکوپی، باسیل گرم (منفی) مشاهده کردیم، سپس در محیط مک کانکی (ساخت شرکت merk) کشت دادیم. محیط مک کانکی را به مدت ۲۴ ساعت در انکوباتور (ساخت شرکت memert آلمان) با دمای ۳۷ درجه سانتی گراد، انکوبه کردیم، بعد از ۲۴ ساعت، کلنی های قرمز رنگ مشاهده کردیم، سپس برای تشخیص خانواده باکتری از آزمایش اکسیداز استفاده کردیم بدین ترتیب که ابتدا، با استفاده از قسمت چوبی سواب استریل، یک کلنی از باکتری های Overnight (کشت یک شبانه روز) شده را روی یک دیسک اکسیداز (ساخت شرکت...) قرار دادیم، از ویژگی های این نوع دیسک، این است که در حالت خشک نتیجه را در همان لحظه نشان می دهد، که برای باکتری مورد نظر، رنگ صورتی که نشان دهنده منفی بودن آزمایش است، مشاهده شد. با توجه به نتایج کشت و آزمایش اکسیداز، باکتری مورد نظر یکی از اعضای انتروباکتریاسه بود، که برای اطمینان از جنس اشیریشیا کلای، کلنی های مورد نظر را روی محیط گالری بردیم، این محیط خود از چندین محیط کشت که شامل: سیمون سیترات آگار^{۲۴۱}، اوره آگار^{۲۴۲}، TSI^{۲۴۳}، MR/VP^{۲۴۴} و SIM^{۲۴۵} است، تشکیل شده است. با توجه به نتایج زیر، از اشیریشیا کلای بودن نمونه اطمینان پیدا کردیم.

Methyl red/Voges-Prausker^{۲۴۴}
Sulphyd Indol Motility^{۲۴۵}

Simon Citrate agar^{۲۴۱}
Urease agar^{۲۴۲}
Triple Sugar Iron agar^{۲۴۳}

TSI (اسید زرد) در سطح محیط و قلیا (قرمز) در عمق محیط، سیترات (منفی)، اوره آز (مثبت)، MR (مثبت) و VP (منفی)، حرکت (مثبت)، اندول (مثبت)، $^{246}\text{H}_2\text{S}$ (منفی)، که نتایج حرکت، اندول و H_2S را در محیط SIM بررسی کردیم، پس از تأیید نمونه ها، به منظور نگهداری سوش های باکتری از آنها به روش زیر استوک تهیه کردیم.



شکل ۱-۳: مجموعه تست های گالری 247 برای تشخیص و تمایز اعضای انتروباکتریاسه



شکل ۲-۳= کلنی های *E. coli* بر روی محیط نوترینت آگار^{۲۴۸}

۳-۵: تعیین الگوی حساسیت آنتی بیوتیکی

از روش استاندارد دیسک دیفیوژن کربی-بایر، بر روی مولر هینتون آگار با استفاده از دستورالعمل CLSI استفاده کردیم. بدین ترتیب که با استفاده از لوپ، کلنی های اشریشیا کلی رشد کرده در محیط نوترینت آگار را به داخل محیط سرم فیزیولوژی بردیم، سوسپانسیونی مطابق نیم مک فارلند ($10^8 \times 1-2$ cfu/ml) تهیه کردیم. برای اطمینان از درستی کار، جذب نوری که معرف کدورت سوسپانسیون مورد نظر است را با دستگاه اسپکتروفتومتر در طول موج ۲۶۳ نانومتر اندازه گیری کردیم که برابر: ۰.۸ شد که با توجه به محدوده قابل قبول (۰/۰۸ تا ۰/۱۳)، مناسب بود. سپس سواب استریلی را به داخل محیط سرم فیزیولوژی بردیم و با گرفتن آب اضافه آن، به صورت کشت چمنی بر روی محیط مولر هینتون آگار کشت دادیم.

سپس دیسک های ایمی پنم^{۲۴۹} (۱۰ μg)، مروپنم^{۲۵۰} (۱۰ μg)، ارتاپنم^{۲۵۱} (۱۰ μg)، کلیستین^{۲۵۲} (۱۰ μg)، لووفلوکساسین^{۲۵۳} (۱۰ μg)، تایگی سیکلین^{۲۵۴} (۱۰ μg)، پپراسیلین^{۲۵۵} (۱۰ μg) تهیه شده در شرکت MAST انگلستان را به فاصله ۲۴ میلی متر از یکدیگر و ۱۸ میلی متر از کناره پلیت قرار دادیم. پلیت ها را در انکوباتور در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد به مدت ۲۴ ساعت قرار دادیم. سپس با اندازه گیری قطر هاله عدم رشد و با توجه به

Colistin^{۲۵۲}
Levofloxacin^{۲۵۳}
Tigecyclin^{۲۵۴}
Piperacillin^{۲۵۵}

Nutrient agar^{۲۴۸}
Imipenem^{۲۴۹}
Meropenem^{۲۵۰}
Ertapenem^{۲۵۱}

جدول زیر که بوسیله اطلاعات موجود در CLSI-M100-s24 تهیه شده است، مقاومت یا حساسیت باکتری ها نسبت به آنتی بیوتیک های مورد نظر را مشخص کردیم.



شکل ۳-۳: روش آنتی بیوگرام برای نمونه های مورد مطالعه

در این آزمون از سویه کنترل ۲۵۹۲۲ *E. coli* ATCC به عنوان کنترل استفاده شد.

جدول ۳-۲ = طیف مقادیر آنتی بیوگرام برای دیسک های این مطالعه

هاله عدم رشد (mm)			
آنتی بیوتیک	حساس (sensitive)	نیمه حساس (ermediate)	مقاوم (resistant)
ایمی پنم	≥ 23	۲۰-۲۲	≤ 19
ارتاپنم	≥ 22	۱۹-۲۱	≤ 18
مروپنم	≥ 23	۲۰-۲۲	≤ 19
لوفلوکساسین	≥ 17	۱۶-۱۴	≤ 13
کلیستین	≥ 11		≤ 10
پیراسیلین	≥ 21	۲۰-۱۸	≤ 17
تترا سایکلین	≥ 15	۱۴-۱۲	≤ 11

۳-۶: تعیین حداقل غلظت مهاري آنتی بیوتیک (MIC)

در مرحله بعد، به منظور تعیین حداقل غلظت آنتی بیوتیک برای مهار رشد اشريشيا کلي (MIC) از روش آگار دایلوژن استفاده کردیم، بنا به سه دلیل از روش آگار دایلوژن به جای براث دایلوژن استفاده کردیم:

۱- خطای آزمایش کمتر ۲- آلودگی کمتر ۳- سهولت در انجام کار

برای انجام آگار دایلوژن، ۲۵ میلی گرم پودرایمی پنم، (ساخت شرکت سیگما-آلدريج)، با درصد خلوص بالای ۹۸ درصد و وزن ملکولی ۳۱۷/۳۶ خریداری کردیم، برای جلوگیری از بروز هر گونه خطای احتمالی، محلول ذخیره (stock) خود را که حاوی ۵۰۰ میکرولیتر از حلال ایمی پنم (بافر فسفات ۰/۰۱ مولار با pH= ۷/۱ برگرفته از CLSI ۲۰۱۴) و ۲۵ میلی گرم پودر ایمی پنم است را در همان ظرف شیشه ای پودرایمی پنم با رساندن به حجم نهایی ۲ میلی لیتر تهیه کردیم.



شکل ۳-۴: پودر ایمی پنم به کار رفته برای MIC، ساخت شرکت Sigma

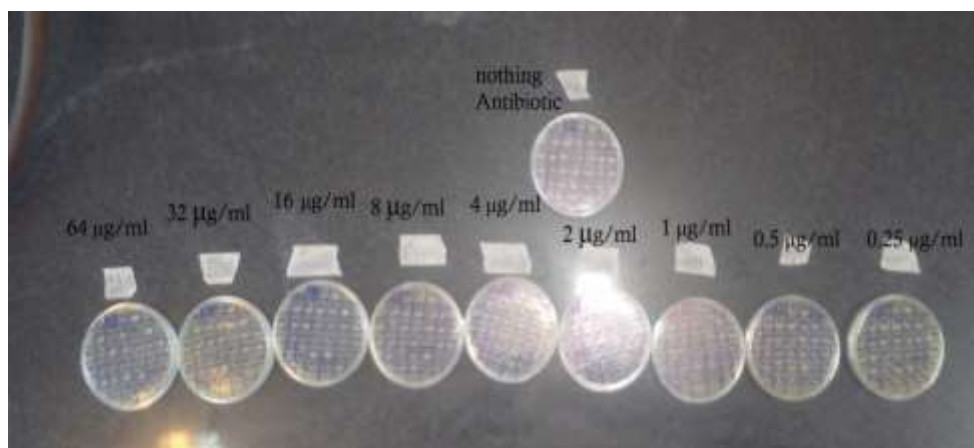
سپس با انجام محاسبات ریاضی و بررسی مقالات دیگر در این زمینه، طیف ۶۴-۰/۲۵ میکروگرم/میلی لیتر را برای انجام کار و پیدا کردن MIC انتخاب کردیم. در این روش از ۹ ارلن و ۹ تیوب ۲ میلی لیتری استفاده کردیم که در هر یک از تیوب ها ۱ میلی لیتر بافر فسفات (با سمپلر ۱۰۰ تا ۱۰۰۰ میکرو لیتر).

سپس یک میلی لیتر از سوسپانسیون تهیه شده را در یک میلی لیتر تیوب بافر فسفات ریختیم. این تیوب غلظتی معادل ۶۴ میکروگرم بر میلی لیتر ($64 \mu\text{g/ml}$) دارد.

یک میلی لیتر بقیه را در تیوب دوم با همان میزان بافر فسفات ریختیم که در ابتدا هماف غلظت تیوب اولی را دارد اما وقتی از تیوب دوم یک میلی لیتر برداشتیم و در تیوب سوم ریختیم، غلظتش نصف غلظت اولیه که معادل ۳۲ میکروگرم بر میلی لیتر ($32 \mu\text{g/ml}$) است شد. و از تیوب سوم به همین میزان برداشتیم و به تیوب چهارم ریختیم که در نتیجه تیوب چهارم غلظتش معادل ۱۶ میکروگرم بر میلی لیتر ($16 \mu\text{g/ml}$) شد و به همین ترتیب تا تیوب نهم انجام دادیم. سپس هر تیوب را در ارلن مخصوص به همان غلظت که حاوی ۱۰۰ میلی لیتر محیط مولر هینتون آگاری که هنوز مایع و البته دمایش هم خیلی زیاد نیست ریختیم. و در نهایت محیط را که حاوی غلظت مشخصی از آنتی بیوتیک است، در ۹ پلیت ۸ سانتی متری ریختیم. قطر محیط ۴ میلی متر است. محیط تهیه شده را به ۳۲ قسمت فرضی تقسیم بندی می کنیم.

سپس همانند روش آنتی بیوگرام برای نمونه هایی که غیر حساس بودند. سوسپانسیونی معادل نیم مک فارلند تهیه کردیم. و ۵۰ میکرولیتر از هریک از نمونه های غیر حساس به هر کارباپنم را (با سمپلر ۱۰-۱۰۰ میکرولیتر) به ۴۵۰ میکرولیتر سرم فیزیولوژی استریل شده اضافه کردیم. سپس به میزان ۲ میکرولیتر از سوسپانسیون تهیه شده را (با سمپلر ۱۰-۰/۵ میکرولیتر) برداشته و به خانه های تشکیل شده در محیط اضافه کردیم. برای آنکه از درستی کار اطمینان کنیم در یک محیط مولر هینتون آگار بدون آنتی بیوتیک ۳۲ قسمتی، نمونه ها را به روش بالا کشت دادیم. البته سویه استاندارد *E. coli* ATCC 25922 را که به صورت کشت یک شبانه بود را به عنوان کنترل مثبت در همه پلیت ها به روش گفته شده، کشت دادیم و پلیت ها را به مدت ۲۴ ساعت دردمای ۳۷ درجه سانتی گراد در انکوباتور، قرار دادیم. بعد از ۲۴ ساعت، جواب ها را مطابق شکل زیر خواندیم:

خوانش پلیت ها را ابتدا از پلیت بدون آنتی بیوتیک شروع کرده و از کمترین غلظت ($0/25$ میکروگرم/میلی لیتر) به سمت بیشترین غلظت ($64 \mu\text{g/ml}$) رفتیم. اولین غلظتی را که در آن رشد نمونه مورد نظر مشاهده نشد، به عنوان کمترین غلظت مهاري آنتی بیوتیک (MIC) برای آن نمونه در نظر گرفتیم.



شکل ۵-۳= نمایی کلی از غلظت های مختلف ایمی پنم در روش MIC

۳-۷: روش هوچ تست اصلاح شده (MHT)

بعد از شناسایی غیر حساس ها به کارباپنم (مروپنم، ایمی پنم، ارتاپنم)، برای اطمینان از وجود مقاومت از نوع کارباپنماز، از روش هوچ تست اصلاح شده (MHT) بدین صورت زیر استفاده کردیم:

در ابتدا رقت ۰/۵ مک فارلند از *E. coli* ATCC 25922 را در ۵ میلی لیتر از براث یا سالین تهیه کردیم. سوسپانسیون تهیه شده به میزان ۱:۱۰ رقیق شد و سپس به صورت یکنواخت برروی محیط مولز هینتون آگار کشت دادیم. یک دیسک مروپنم در مرکز پلیت قرار دادیم. سپس ارگانیسم مشکوک به کارباپنم را به صورت یک خط مستقیم از لبه ی دیسک تا کناره های پلیت کشیدیم. پلیت را به مدت ۲۴-۱۶ ساعت دردمای ۳۷ درجه سانتی گراد انکوبه کردیم (شناسایی انزیم های کارباپنماز در انتروباکتریاسه. (ابتدا سوش اشیریشیا کلای استاندارد ATCC 25922 و سوش های غیر حساس به هر یک از کارباپنم ها (ایمی پنم، مروپنم، ارتاپنم) را به ترتیب در محیط بلاد آگار و نوترینت آگار کشت دادیم و آنها را به مدت ۲۴ ساعت در شرایط انکوباسیون (۳۷ درجه سانتی گراد) انکوبه کردیم.

سپس از اشیریشیا کلای استاندارد شده نیم مک فارلند تهیه کردیم و برای اطمینان از غلظت کافی باکتری آن را در دستگاه اسپکتروفتومتر (در طول موج ۲۶۵ نانومتر) قرار دادیم. (جذب نوری قابل قبول ۰/۰۸ تا ۰/۱ است) که برای محلول نیم مک فالند ما همان ۰/۱ بود. سپس از محلول نیم مک فارلند تهیه شده با سمپلر ۱۰۰ تا ۱۰۰۰ میکرولیتر،

۵۰۰ میکرولیتر (معادل ۵ میلی لیتر) برداشتیم و در ۴/۵ میلی لیتر از سرم فیزیولوژی استریل با همان سمپلر ریختیم، و بدین ترتیب یک رقت ۱:۱۰ از محلول کارمان تهیه کردیم. از محلول تهیه شده با سواپ استریل روی محیط مولر هینتون اگر کشت چمنی دادیم پس از خشک شدن محیط یک دیسک مروپنم را در وسط محیط قرار دادیم و سپس از ایزوله های غیر حساس به هر یک از کارباپنم ها، ۳ تا ۵ کلنی با سواپ استریل برداشتیم و از لبه پلیت تا نزدیکی دیسک به صورت یک خط مستقیم کشیدیم. پلیت را به مدت ۲۴ ساعت انکوبه کردیم)



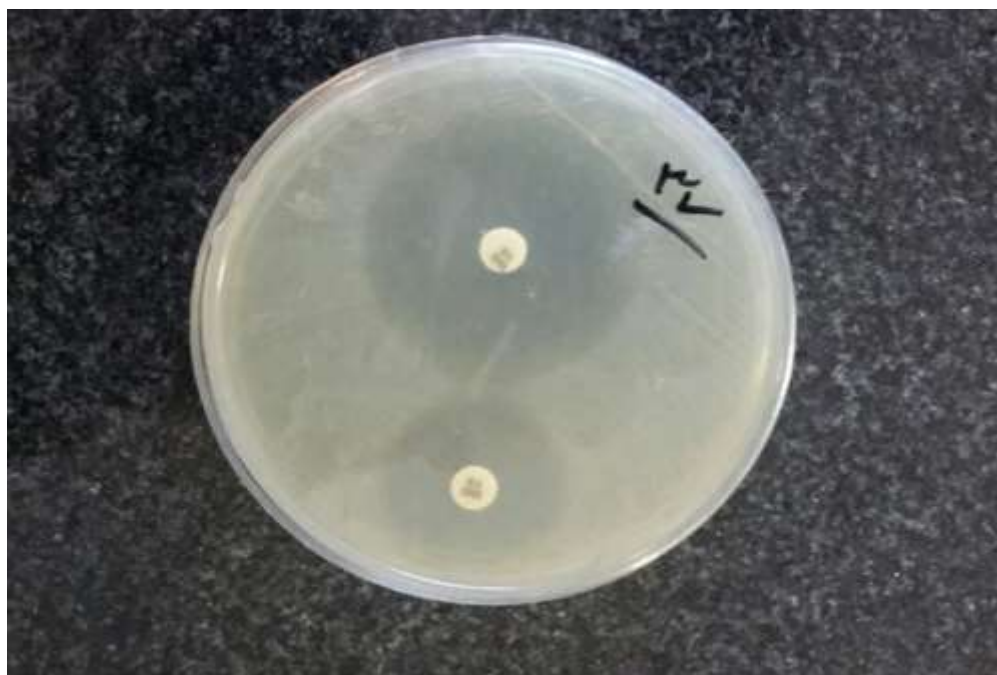
شکل ۳-۶= روش MHT با استفاده از دیسک مروپنم

نمونه هایی که هاله عدم رشدشان به صورت برگ شبدری (همراه با تو رفتگی به سمت دیسک) است سویه مثبت از نظر وجود کارباپنماز است و نمونه هایی که هاله عدم رشدشان به صورت یک هاله عدم رشد ساده (بدون تو رفتگی) است، سویه منفی از لحاظ کارباپنماز است.

۳-۸: روش دیسک ترکیبی

در روش دیسک دیفیوژن ترکیبی، غلظت نیم مک فارلند از نمونه های مقاوم به ایمی پنم تهیه و روی محیط مولر هینتون آگار کشت چمنی داده شد. پس از چند دقیقه دو عدد دیسک ایمی پنم ۱۰ میکروگرمی با فاصله قرار داده شد. روی یکی از دیسک ها، ۱۰ میکرولیتر اتیلن دی آمین تترا استیک اسید (EDTA) ۰/۵ مولار ریخته و به مدت ۱۸ تا ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد انکوبه شد. سپس هاله عدم رشد دیسک ایمی پنم و دیسک ایمی

پنم به همراه EDTA (ایمی پنم + EDTA) با یکدیگر مقایسه شدند و نمونه هایی که هاله عدم رشد دیسک ایمی پنم + EDTA آن، ۷ میلی متر بیش تر از دیسک ایمی پنم بود، به عنوان متالوبتالاکتاماز مثبت در نظر گرفته شدند برای انجام دیسک ترکیبی، پس از اندازه گیری پودر اتیلن دی آمین تترا استیک اسید EDTA ۰/۵ مولار تهیه کردیم. آن را در ۵ سی سی آب مقطر حل کردیم که به دلیل پایین بودن pH (pH=۴/۶۰)، در آن حل نشد، برای حل شدن سوسپانسیون آن را به pH=۸ برسانیم که برای این کار از محلول ۰/۰۱ مولار سدیم هیدروکسید (NaOH)، استفاده کردیم. محلول حاصل را در اتوکلاو (در شرایط دمایی ۱۲۱ درجه سانتی گراد و فشار ۱ اتمسفر و مدت زمان ۱۰ دقیقه) قرار دادیم. سپس همانند روش کربی بایر (آنتی بیوگرام به روش دیسک ترکیبی)، برای هریک از نمونه های غیر حساس به هریک از کارباپنم ها، سوسپانسیونی مطابق نیم مک فارلند تهیه کردیم و هر یک از سوسپانسیون ها را در محیط مولر هینتون اگر به صورت چمنی کشت دادیم. دو دیسک ایمی پنم را بر روی محیط، گذاشتیم و روی یکی از آن ها، ۱۰ میکرولیتر از EDTA تهیه شده ریختیم. پس از آن که کمی دیسک خشک شد. آن را در انکوباتور به مدت ۲۴ ساعت، قرار دادیم.



شکل ۷-۳= روش دیسک ترکیبی

۹-۳: تست واکنش زنجیره ای پلی مرز (PCR)

تست PCR یک تست اختصاصی و حساس برای تشخیص قطعی کاربایتم ها، برای انجام واکنش زنجیره ای پلی مرز (PCR)، ابتدا DNA سویه های مثبت در تست فنوتیپی، با روش جوشاندن (Boiling) استخراج گردید. در روش جوشاندن، ابتدا نمونه هایی که یک شبانه روز کشت داده شده اند را در $500 \mu\text{l}$ آب مقطر استریل تلقیح کردیم، سپس باکتری را در بن ماری (۹۰ درجه سانتی گراد) به مدت ۲۵ دقیقه جوشاندیم. با کمک سانتریفوژ با سرعت ۱۳۰۰۰ دور در دقیقه، به مدت ۱۰ دقیقه، DNA را از باکتری استخراج کردیم. محلول رویی را حاوی DNA باکتری بود برای انجام کار PCR استفاده کردیم. برای اطمینان از غلظت DNA باکتری، ۲ میکرولیتر از محلول رویی را نانودراپ کردیم و در طول موج ۲۳۰ نانومتر، نسبت ۲۶۰ به ۲۸۰ برابر با ۱/۹ بود (طیف مناسب بین ۱/۸ تا ۲ است).

جدول ۳-۳ = پرایمرهای به کار رفته در این مطالعه

primer	Sequence(5'→ 3')	base pair(bp)	Reference
<i>bla</i> _{NDM-1}	F(GGCGGAATGGCTCATCACGA) R(CGCAACACAGCCTGACTTTC)	۵۷۰	(۱۳۹)
<i>bla</i> _{IMP-1}	F(ACCGCAGCAGAGTCTTTGCC) R(ACAACCAGTTTTGCCTTACC)	۵۸۷	(۱۹۱)
<i>bla</i> _{AIM}	F(CTGAAGGTGTACGGAAACAC) R(GTTCGGCCACCTCGAATTG)	۳۲۲	(۱۹۲)

در این مطالعه با توجه به وزن ژن های مورد نظر، ژل ۱ درصد تهیه کردیم. برای تهیه ژل ۱ درصد در قالب کوچک، ۱/۳ گرم پودر آگارز در ۱۳۰ میلی لیتر TBE بافر X۱ حل کرده و آن را جوشاندیم تا کاملاً آگارز در داخل آن حل شود و محلول شفاف گردد. پس از رسیدن دمای محلول آگارز ساخته شده به حدود ۴۵ تا ۵۰ درجه به ازای هر ۱۰ میلی لیتر ژل، یک میکرولیتر محلول اتیدیوم بروماید اضافه کرده و در نهایت ژل داخل قالب ریخته ریختیم. ۵ میکرولیتر از محلول PCR را با یک میکرولیتر بافر سنگین کننده Loading buffer 6x کاملاً مخلوط کرده و سپس به آرامی داخل چاهک ها ریختیم. سپس به مدت ۶۰ دقیقه در ولتاژ مناسب، الکتروفورز کردیم. پس از انجام

الکتروفورز، ژل را که حاوی محصولات PCR بود، از تانک خارج کردیم و در دستگاه ژل داک (Gel Doc) به کمک اشعه فرابنفش (U.V) ژل را از نظر وجود ژن مورد نظر بررسی کردیم.

جدول ۳-۴ = مقادیر ترکیبات به کار رفته برای انجام PCR برای هر نمونه

غلظت	حجم (میکرولیتر)	ترکیبات واکنش
	۱۰/۵	Distilled water
	۱۲/۵	Master mix
10 pmol	۰/۵	Primer forward
10 pmol	۰/۵	Primer reverse
	۱	Template DNA
	۲۵	حجم کل

جدول ۳-۵ = شرایط ایده آل دمایی و زمانی فرآیند PCR برای پرایمر های این مطالعه

Gene	Initial denaturation	denaturation	annealing	Extension	Final Extension
<i>bla</i> _{NDM-1}	۹۶°C/ ۵ دقیقه	۹۶°C/ ۱ دقیقه	۵۳°C/ ۱ دقیقه	۷۲°C/ ۱ دقیقه	۷۲°C/ ۷ دقیقه
<i>bla</i> _{IMP}	۹۶°C/ ۵ دقیقه	۹۶°C/ ۱ دقیقه	۵۳°C/ ۱ دقیقه	۷۲°C/ ۱ دقیقه	۷۲°C/ ۱۰ دقیقه
<i>bla</i> _{AIM}	۹۵°C/ ۵ دقیقه	۹۵°C/ ۱ دقیقه	۵۳°C/ ۱ دقیقه	۷۲°C/ ۵ دقیقه	۷۲°C/ ۷ دقیقه

۳-۱۰: روش جمع آوری و تجزیه و تحلیل داده ها:

پس از جمع آوری داده ها یافته در قالب جداول فراوانی نمودار شاخص های عددی ارائه گردید برای تحلیل داده ها از آزمون مجذور کای و تست دقیق فیشر استفاده شد. داده ها به وسیله نرم افزار SPSS ویرایش ۱۹ تجزیه و تحلیل شد. مقدار P value کمتر از ۰/۰۵ از لحاظ آماری معنی دار در نظر گرفته شد.

فصل چہارم

نتائج

۴-۱: یافته های زمینه ای

۲۶۷ ایزوله اشیریشیا کلی در بین سال های ۱۳۹۳-۱۳۹۴ از بخش مراقبت های ویژه بیمارستان های آموزشی قزوین تهران و کرج جدا شد که بر اساس شهر های مورد مطالعه ۱۹۳ ایزوله (۷۲/۲٪) از بیمارستان های کرج، ۳۹ ایزوله (۱۴/۵٪) از بیمارستان های قزوین و ۳۵ ایزوله (۱۳/۳٪) از بیمارستان های تهران جدا شد. بر طبق جدول زیر

بیشترین تعداد ایزوله جدا شده در بیمارستان های قزوین، مربوط به بیمارستان بوعلی با ۱۸ ایزوله (۴۶/۱۵٪) می باشد.

جدول ۴-۱ = تعداد ایزوله ها به تفکیک بیمارستان های شهر قزوین

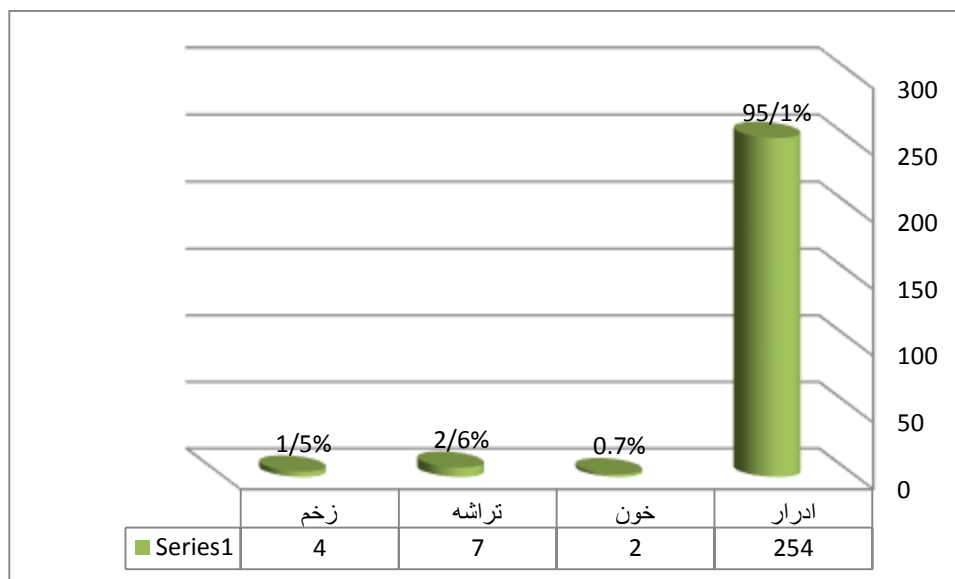
بیمارستان	تعداد ایزوله	درصد
بو علی	۱۸	۴۶/۱۵
کوثر	۷	۱۷/۹۴
قدس	۷	۱۷/۹۴
رجائی	۳	۷/۶۹
رازی	۴	۱۰/۲۵
مجموع	۳۹	۱۰۰

۲۶۷ ایزوله اشیریشیا کلی در بین سال های ۱۳۹۳-۱۳۹۴ از بخش مراقبت های ویژه بیمارستان های آموزشی قزوین تهران و کرج جدا شد که با توجه به جدول زیر، ۱۷۵ ایزوله مربوط به جنس زن و ۹۲ ایزوله مربوط به جنس مرد بود.

جدول ۴-۲ = فراوانی ایزوله های اشیریشیا کلی جمع آوری شده از بخش های مراقبت ویژه شهر های تهران، کرج و قزوین به تفکیک جنسیت

جنس	تعداد ایزوله	درصد
زن	۱۷۵	۶۵/۵
مرد	۹۲	۳۴/۵
مجموع	۲۶۷	۱۰۰

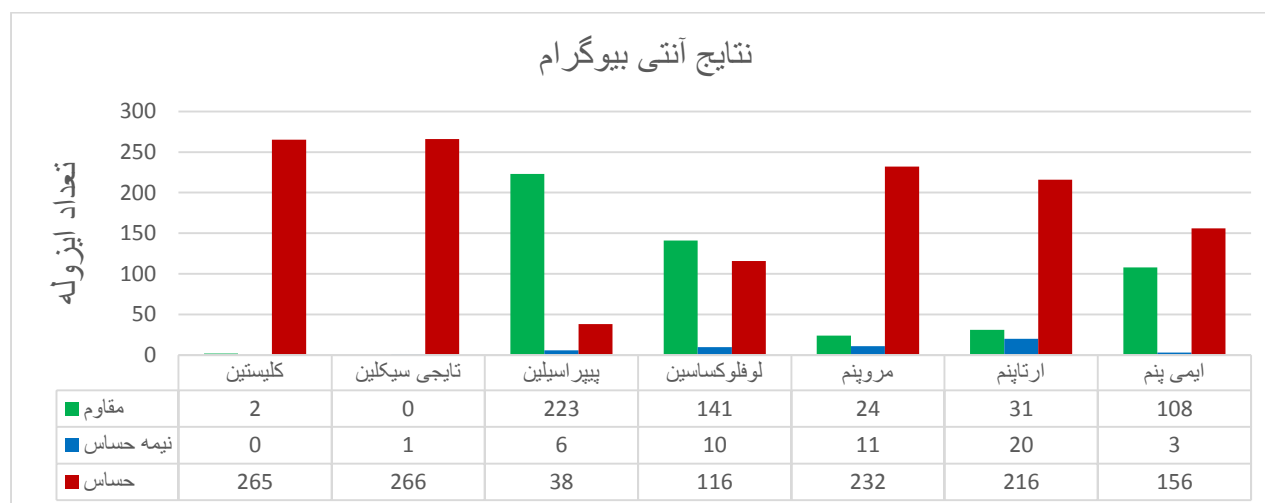
همچنین براساس نوع نمونه جدا شده، بیشترین نمونه (۲۵۴ ایزوله) مربوط به نمونه ادرار بود



نمودار ۱-۴ = توزیع فراوانی نسبی ایزوله های جمع آوری شده بر اساس نمونه

۴-۲: نتایج آنتی بیوگرام:

۲۶۷ نمونه از بخش ICU بیمارستان های آموزشی قزوین، تهران و کرج جدا شد، که به کمک رنگ آمیزی گرم، و تست های بیوشیمیایی مثل TSI، MRVP، SIM، تجزیه سیترات و اوره آز، نمونه ها را از لحاظ وجود اشريشيا کلي بررسی کردیم. با انجام تست فنوتیپی "دیسک دیفیوژن"، غربالگری اولیه ای برای میزان مقاومت در ایزوله به دیسک های مورد مطالعه شناسایی کردیم، که شامل: لوفلوکساسین، ۱۵۱ ایزوله (۵۶/۵۵٪)، پیپراسیلین، ۲۲۹ ایزوله (۸۵/۷٪)، کلیستین، ۲ ایزوله (۰/۷٪)، ایمی پنم ۱۱۱ ایزوله (۴۱/۶٪)، ارتاپنم ۵۱ ایزوله (۱۹/۱٪)، مروپنم ۳۵ ایزوله (۱۳/۱٪)، را شامل می شود که در این میان همه ایزوله ها به تایجی سیکلین حساس بودند.



نمودار ۲-۴ = نتایج آنتی بیوگرام برای نمونه های مورد مطالعه

۳-۴: نتایج حداقل غلظت مهاري آنتی بیوتیک (MIC)

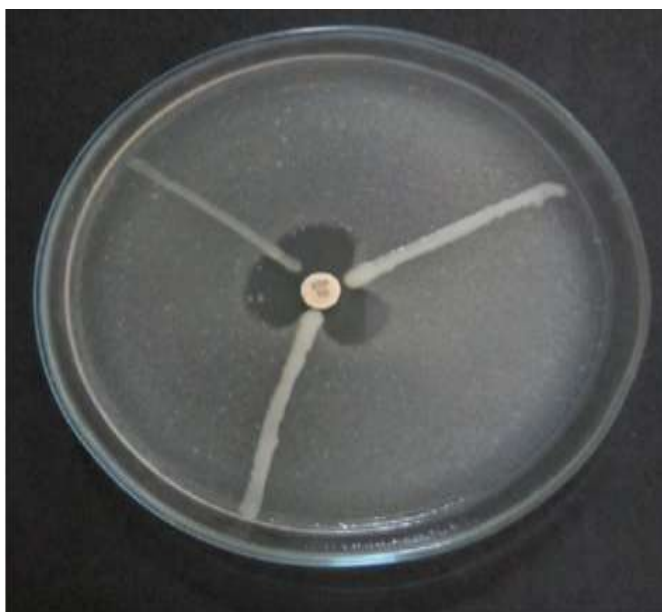
در مجموع از بین ۲۶۷ ایزوله مورد مطالعه، ۶۷ ایزوله (۲۵/۰۹٪) در غلظت آنتی بیوتیکی $64 \mu\text{g/ml}$ > به ایمی پنم مقاوم بودند نتایج کامل را می توانید در جدول زیر ببینید.

جدول ۳-۴ = نتایج MIC برای ایزوله های اشریشیاکلی جدا شده از بیماران

غلظت آنتی بیوتیک	تعداد	درصد	MIC ₅₀ MIC ₉₀
< ۰/۲۵ $\mu\text{g/ml}$	۴۱	۱۵/۳۵	MIC ₅₀ ۱ $\mu\text{g/ml}$ MIC ₉₀ > ۶۴ $\mu\text{g/ml}$
۰/۲۵ $\mu\text{g/ml}$	۳۸	۱۴/۲۳	
۰/۵ $\mu\text{g/ml}$	۴۱	۱۵/۳۵	
۱ $\mu\text{g/ml}$	۴۱	۱۵/۳۵	
۲ $\mu\text{g/ml}$	۱	۰/۳۷	
۴ $\mu\text{g/ml}$	۱	۰/۳۷	
۸ $\mu\text{g/ml}$	۱	۰/۳۷	
۱۶ $\mu\text{g/ml}$	۳	۱/۱۲	
۳۲ $\mu\text{g/ml}$	۱۱	۴/۱۱	
۶۴ $\mu\text{g/ml}$	۲۲	۸/۲۳	
> ۶۴ $\mu\text{g/ml}$	۶۷	۲۵/۰۹	
مجموع	۲۶۷	۱۰۰	

۴-۴: نتایج روش هوچ تست اصلاح شده (MHT)

در تشخیص وجود مقاومت از نوع "کارباپنماز" در ۱۳۱ نمونه غیر حساس، تست MHT را انجام دادیم. که در ۷۰ ایزوله (۵۳/۴۳٪) مثبت شد.



شکل ۴-۱: روش هوج تست اصلاح شده (MHT) برای شناسایی ایزوله های مولد کارباپنماز

۴-۵: نتایج روش دیسک ترکیبی

همچنین، برای بررسی وجود متالوبتالاکتاماز تست دیسک ترکیبی را انجام دادیم که از ۱۳۱ ایزوله غیر حساس به حداقل هریک از کارباپنم ها، ۴۸ ایزوله (۳۶/۶۴٪) از لحاظ وجود متالوبتالاکتاماز مثبت گزارش کردیم.



شکل ۴-۲: روش دیسک ترکیبی برای شناسایی ایزوله های مولد متالوبتالاکتاماز

۴-۶: نتایج روش واکنش زنجیره ای پلی مرارز (PCR)

در میان ۱۳۱ ایزوله مورد آزمایش، هیچ یک از ایزوله های مورد مطالعه حاوی ژن، bla_{IMP} , bla_{NDM-1} , bla_{AIM} نبودند.



شکل ۳-۴= نتایج روش PCR برای شناسایی ژن های مورد مطالعه

فصل پنجم

بحث و نتیجه گیری

۵-۱: بحث

مقاومت آنتی بیوتیکی در بین باکتری ها از سال های دور یکی از مشکلات بهداشتی درمانی در سطح دنیا بوده است. بیماران بستری در ICU در معرض خطر بیشتری برای ابتلای به عفونت های بیمارستانی می باشند، به طوریکه تقریباً ۲۵٪ عفونت های بیمارستانی و ۹۰٪ طغیان ها در بخش های مراقبت ویژه بیمارستان ها رخ می دهد. بنابراین بخش های مراقبت ویژه از قسمت های خطیر بیمارستان می باشند. باسیل های گرم منفی با مقاومت چندگانه از پاتوژن های مهم بخش های ICU می باشند که سبب نرخ بالای مرگ و میر در بیماران بستری در ایت بخش ها می گردد (۱۹۳).

در این میان، *E. coli* شایع ترین علت ایجاد عفونت های مجاری ادراری و همچنین یک پاتوژن مهم در مننژیت نوزادان، و عفونت های تنفسی و سپس در بیماران بستری در بخش های مختلف بیمارستان به ویژه، ICU، می باشند. مقاومت آنتی بیوتیکی در بین سویه های *E. coli* بسیار شایع است و این به سبب کسب فاکتورهای مقاومت متعدد می باشد (۱۹۴). در این مطالعه در مجموع ۲۶۷ ایزوله اشریشیاکلی از مراکز بیمارستان شهرهای قزوین، کرج و تهران جداسازی شدند. نتایج این مطالعه نشان داد که نقش مهم و قابل توجه این ارگانیسم ها در ایجاد عفونت هایی به ویژه عفونت های وابسته به ابزارهای تهاجمی از جمله سوند های ادراری تأکید دارد. همچنین در این مطالعه، ایزوله های اشریشیاکلی از بیمارستان بستری در بخش های مراقبت ویژه (ICU) جمع آوری شدند. به نظر می رسد بستری طولانی مدت بیمارستان در این بخش، وخیم بودن حال بیماران، به کار بردن ابزارهای تهاجمی درمانی از قبیل تراشه، ونتیلاتور، سوندهای ادراری و کاتتر، مواجه بودن با آنتی بیوتیک های وسیع الطیف و نهایتاً نبود ابزارها و راهکارهای مناسب کنترل عفونت از دلایل عمده شیوع ارگانیسم های مقاوم در این بخش می باشد (۸).

در مطالعه ای در سال ۲۰۱۲ که توسط میلاد مسایلی و همکارانش در بیمارستان های بعثت ۷۴/۳٪ از نمونه ها در این بیمارستان جمع آوری شده بود) و توحید (مابقی نمونه ها از این بیمارستان) سنندج صورت گرفت. از ۴۲۳ نمونه کلینیکی، ۱۲۷ نمونه (۳۰٪) تولید کننده ۲۹۶ MBLs نمونه ۷۰٪ از نظر دارا بودن این آنزیم منفی گزارش گردید -۴۱ نفر سابقه بستری در ICU و ۶۸ بیمار بستری در ICU بودند. عفونت دستگاه ادراری بیشترین منبع فراوانی نمونه ها بود، *E. coli* بیشترین فراوانی داشت (۶۱/۱٪) که ۳۱/۸٪ آنها MBLs مثبت بودند. از ۹۸ بیمار

سرپایی ۲۴ مورد MBLs مثبت بودند (۲۱)، در یک مطالعه ای که توسط بوداک و انکول بین سال های ۲۰۰۹ تا ۲۰۱۱ در ترکیه انجام شده بود، از ۱۰۸ مورد عفونت بیمارستانی، ۶۸ (۵۲٪)، اشريشيا کلاي، گزارش شد، که از این تعداد، تنها ۲ مورد (۳٪)، اشريشيا کلاي مقاوم به ارتاپنم جدا شده از بخش ICU شناسایی شد (۳۴). این در حالی است که، در یک مطالعه که بین مارچ ۲۰۱۲ تا دسامبر ۲۰۱۲ در بیمارستان الزهرا اصفهان توسط رضا مؤیدنیا و همکارانش انجام شد، از ۱۰۸۰ ایزوله اشريشيا کلی (۷۲۰ ایزوله بیمارستانی و ۳۶۰ ایزوله غیر بیمارستانی)، ۲ ایزوله بیمارستانی (۰/۳٪) حاوی MBL بودند، این در حالی است که هیچ ایزوله ی غیر بیمارستانی، به عنوان MBL گزارش نشد (۱۲۷).

در یک مطالعه که در سال ۱۳۹۰ توسط سارا عبدالهی خیر آبادی، و همکاران در شهرستان فسا انجام شده بود، از ۲۳۴ ایزوله اشريشيا کلاي ۸۶/۹٪ حساس به ایمی پنم شناسایی شد (۳۷).

در یک مطالعه که توسط لینگ ما و همکارانش، در سال های ۲۰۱۰ و ۲۰۱۲ در مؤسسه ملی تحقیقات در تایوان انجام شد، در سال ۲۰۱۰ از ۸ بیمارستان، ۳۲ ایزوله اشريشيا کلی غیر حساس و یا حساس به مروپنم بودند، همچنین در سال ۲۰۱۲ از ۱۷ بیمارستان (۴۳ ایزوله اشريشيا کلی)، جدا شد. در سال های ۲۰۱۰ تا ۲۰۱۲، همه ایزوله های اشريشيا کلی، به ارتاپنم مقاوم بودند (187)، این در حالی است که در یک مطالعه ی دیگر که در بیمارستان آموزشی مراقبت در مرکز نیال در سال ۲۰۱۲ از جولای تا دسامبر انجام شده بود، از ۲۱۶ ایزوله *E. coli* که از ICU و دیگر بخش های بیمارستان جدا شده بود، ۴۱ ایزوله (۱۸/۹۸٪) از نظر فنوتیپی به مروپنم یا ارتاپنم مقاوم بودند (30)، با این حال، در یک بررسی که در بین سال های ۲۰۰۹ تا ۲۰۱۱ توسط فرشته شاهچراغی و همکاران در تهران انجام شد، از ۲۴۴ ایزوله اشريشيا کلاي، ۹ ایزوله (۳/۶۸٪) به مروپنم، ۱ ایزوله (۰/۴٪) به ایمی پنم، ۲ ایزوله (۰/۸٪) به ارتاپنم مقاوم گزارش شدند (۳۵). همچنین در یک مطالعه که بین مارچ ۲۰۱۲ تا دسامبر ۲۰۱۲ در بیمارستان الزهرا اصفهان توسط رضا مؤیدنیا و همکارانش انجام شد، از ۷۲۰ ایزوله اشريشيا کلی، ۹ ایزوله (۱/۲٪) به ایمی پنم، ۱۴ ایزوله (۱/۹٪) به مروپنم و ۸ ایزوله (۱/۱٪) به ارتاپنم مقاوم گزارش شد (۱۲۷). همچنین، در یک مطالعه که در سال ۲۰۱۲ در بیمارستانی در شمال فلسطین، توسط غالب آدوان، بر روی ۷۹

ایزوله اشريشيا کلي انجام شده بود، ۳۰ ايزوله (۳۸٪) مقاوم به مروپنم و ۳۵ ايزوله (۴۴/۳٪) مقاوم به ايمي پنم، گزارش شد (195).

در مطالعه ای در سال ۲۰۱۲ در فرانسه ۳۴۳ گونه توليد کننده کارباپنماز از میان ۱۴۸۵ گونه شناسایی شد که بیشترین گونه ها را *E. coli* تشکیل میداد که ۸٪ *bla_{NDM}* و کمتر از ۱٪ *bla_{IMP}* بودند (۴۲).

در یک مطالعه ای که در آزمایشگاه پزشکی میکروکو در ژاپن در سال های بین ۲۰۰۱ تا ۲۰۱۲، توسط شیگی یوکی نوتا که و همکارانش انجام شد، از بین ۶۴ ايزوله انتروباکتریاسه مولد *IMP*، که از این میان ۵ ايزوله (۷/۸۱ درصد) اشريشياکلي حاوی ژن *IMP-1* بودند این درحالی است که، در یک مطالعه که توسط Tawfik Abd Motaleb (تاوفیک عبدالمطلب)، در سالهای ۲۰۱۱ تا ۲۰۱۲ بر روی ۱۰۵ ايزوله حاوی متالوبتالاکتاماز جدا شده از

ICU بیمارستانی در مصر انجام شد. ۱۱ ايزوله مربوط به اشريشيا کلای بود که از این ۱۱ ايزوله، ۵ ايزوله (۴۵/۴٪) حاوی *bla_{IMP}* بودند (۳۹)، این در حالی است که، در یک مطالعه ای در بیمارستان شهید بهشتی کاشان که توسط آتیه سادات معینی و همکارانش در سال های ۲۰۱۲ تا ۲۰۱۳، بر روی ۱۳۴ ايزوله اشريشيا کلي، انجام شد. همه ايزوله ها به ايمي پنم حساس بودند (196).

در یک مطالعه که در سال های ۲۰۰۴ تا ۲۰۱۴ توسط جوزف یایان در بیمارستان هلیوس آلمان، بر روی ۲۴۰ بیمار مبتلا به پنومونیه ناشی از اشريشيا کلي، انجام شد، همه ايزوله ها به ايمي پنم حساس بودند (۱۹۷). این یافته ها با مطالعه ای که در تهران توسط اکبر میر صالحیان و همکارانش انجام شد، نیز مطابقت دارد (۱۹۸).

در یک مطالعه در سال ۲۰۰۸، که توسط انوورو و همکارانش در نیجریه بر روی ۶۰ نمونه بیمارستانی انجام شد. ۲۸ نمونه از لحاظ اشريشيا کلي مثبت بودند، که همگی به ايمي پنم حساس بودند (۱۸۸).

در مطالعه ای که توسط گیسله پیرانو (Gisele peirano) و همکارانش در بین سال های ۲۰۰۸ تا ۲۰۱۳ بر روی ۴۰۷ نمونه اشريشيا کلای ST 131 انجام شده بود، در ۱۱۶ ايزوله اشريشيا کلای، حضور *bla_{NDM}*, *bla_{VIM}*, *bla_{IMP}* مثبت اعلام شد، که از میان ۴۴ نمونه (۳۸٪) ژن *bla_{NDM}*، ۲ نمونه (۲٪) ژن *bla_{VIM-1}* و ۲ نمونه (۲٪) حاوی ژن *bla_{IMP}* اعلام شدند و بقیه حاوی ژن های دیگر بودند (۱۹۹)، در یک بررسی دیگر، که توسط بهاسکار مانازا و همکارانش در بین سال های ۲۰۱۰ تا ۲۰۱۲ در جنوب هند انجام شد، از میان ۹۳ ايزوله جدا شده از

بیمارستان ها (۵۹ ایزوله کلبسیلا، ۸ ایزوله اشريشيا کلي و ۲۶ ايزوله انتروباکتر)، ۶۶ ايزوله (۷۰/۶٪) حاوی ژن *bla*_{NDM-1} بودند. این در حالی است که از ۸ ايزوله اشريشيا کلي ۶ ايزوله (۷۵٪) حاوی ژن *bla*_{NDM-1} بودند (۱۸۶).

۵-۲: نتیجه گیری

نتایج این مطالعه نشان داد که نقش مهم و قابل توجه این ارگانیسم ها در ایجاد عفونت هایی به ویژه عفونت های وابسته به ابزارهای تهاجمی از جمله سوند های ادراری تأکید دارد. همچنین در این مطالعه، ایزوله های اشريشياکلي از بیمارستان بستری در بخش های مراقبت ویژه (ICU) جمع آوری شدند. به نظر می رسد بستری طولانی مدت بیمارستان در این بخش، وخیم بودن حال بیماران، به کار بردن ابزارهای تهاجمی درمانی از قبیل تراشه، ونتیلاتور، سوندهای ادراری و کاتتر، مواجه بودن با آنتی بیوتیک های وسیع الطیف و نهایتا نبود ابزارها و راهکارهای مناسب کنترل عفونت از دلایل عمده شیوع ارگانیسم های مقاوم در این بخش می باشد

۵-۳: پیشنهادات

با توجه به ماهیت سیار عناصر انتقال دهنده این نوع مقاومت و با در نظر گرفتن اینکه ارگانیسم های حاوی این انزیم ها الگوهای مقاومت دارویی گسترده را نشان می دهند لذا پیشنهاد می شود که مطالعاتی در زمینه ژن های سیار و فراوانی های آنها در بخش های مختلف بیمارستان در اتخاذ تصمیمات پیشگیرانه در جلوگیری از انتشار اینگونه سویه ها و انتخاب پروتکل درمانی مناسب مورد استفاده قرار گیرد. همچنین به پزشکان محترم توصیه می شود که، در زمینه مقاومت آنتی بیوتیکی میکروارگانیسم ها، مطالعات گسترده تری انجام دهند و در نتیجه به تجویز داروی مناسب اقدام کنند. بدیهی است که ایجاد رابطه عمیق تر بین پزشک و آزمایشگاه می تواند در جلوگیری از این گونه مقاومت ها، نقش به سزایی داشته باشد.

فصل ششم

منابع

١. Rosenthal VD. Device-associated nosocomial infections in limited-resources countries: findings of the International Nosocomial Infection Control Consortium (INICC). *Am J Infect Control*. 2008 Dec;36(10):S171 e7-12. PubMed PMID: 19084148.
٢. Inweregbu K ,Dave J, Pittard A. Nosocomial infections. *Continuing Education in Anaesthesia, Critical Care & Pain*. 2005;5(1):14-7.
٣. Yang K, Zhuo H, Guglielmo BJ, Wiener-Kronish J. Multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* ventilator-associated pneumonia: the role of endotracheal aspirate surveillance cultures. *Ann Pharmacother*. 2009 Jan;43(1):28-35. PubMed PMID: 19033484. Pubmed Central PMCID: 2711849.
٤. Curcio DJ. Antibiotics prescription in intensive care units in Latin America. *Latinoamérica*. 2011;10:11.
٥. Jain S, Khety Z. Changing antimicrobial resistance pattern of isolates from an ICU over a 2 year period. *J Assoc Physicians India*. 2012;60:27-8.
٦. Kucukates E. Antimicrobial resistance among Gram-negative bacteria isolated from intensive care units in a Cardiology Institute in Istanbul, Turkey. *Japanese journal of infectious diseases*. 2005;58(4):228.
٧. Al-Zarouni M, Senok A, Rashid F, Al-Jesmi SM, Panigrahi D. Prevalence and antimicrobial susceptibility pattern of extended-spectrum beta-lactamase-producing *Enterobacteriaceae* in the United Arab Emirates. *Medical Principles and Practice*. 2008;17(1):32-6.
٨. Mohammadi-Mehr M, Feizabadi M. Antimicrobial resistance pattern of Gram-negative bacilli isolated from patients at ICUs of Army hospitals in Iran. *Iranian journal of microbiology*. 2011;3(1):26-30.
٩. Duce G, Fabry J, Nicolle L. Prevention of hospital acquired infections: a practical guide. *Prevention of hospital acquired infections: a practical guide*. 2002 (Ed. 2).
١٠. Mulvey MR, Simor AE. Antimicrobial resistance in hospitals: how concerned should we be? *Canadian Medical Association Journal*. 2009;180(4):408-15.
١١. Mendonça N, Manageiro V, Robin F, Salgado MJ, Ferreira E, Caniça M, et al. The Lys234Arg substitution in the enzyme SHV-72 is a determinant for resistance to clavulanic acid inhibition. *Antimicrobial agents and chemotherapy*. 2008;52(5):1806-11.
١٢. Escudero E, Vinue L, Teshager T, Torres C, Moreno M. Resistance mechanisms and farm-level distribution of fecal *Escherichia coli* isolates resistant to extended-spectrum cephalosporins in pigs in Spain. *Research in veterinary science*. 2010;88(1):83-7.
١٣. Falagas M, Karageorgopoulos DE. Extended-spectrum β -lactamase-producing organisms. *Journal of Hospital infection*. 2009;73(4):345-54.
١٤. Brooks GF ,Butel JS, Ornston LN. Jawetz, Melnick and Adelberg's medical microbiology: USA: Prentics-Hall International, 1989; 1989.
١٥. Murray PR, Rosenthal KS, Pfaller MA. *Medical microbiology*: Elsevier Health Sciences; 2015.
١٦. DJ Brenner JS, NR Kreig. *Bergey's manual of systematic bacteriology, the proteobacteria*. 2th ed. Springer2005.

۱۷. CR Mahon DL, G Manuselis Jr. Textbook of diagnostic microbiology. third edition ed2007. 502-41 p.
۱۸. Ruppé E HS, Lath S, Gautier V, Arie F, Sarthou J L. CTX-M β -Lactamases in *Escherichia coli* from Community-acquired Urinary Tract Infections, Cambodia. *Emerg Infect Dis*. 2009;15(5):741-8.
۱۹. Borriello SP MP, Funke G. Topley and Wilson's Bacteriology. 10 th ed ed. London2005.
۲۰. SH J. Survey frequency of extended spectrum betalactamases in (ESBL) *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumonia* strains isolated from urinary tract infection in Iran. *African J Microbiol Res*. 2011;5:3711-5.
۲۱. Lecointre G, Rachdi L, Darlu P, Denamur E. *Escherichia coli* molecular phylogeny using the incongruence length difference test. *Molecular biology and evolution*. 1998;15(12):1685-95.
۲۲. Britannicacom [Internet]. Retrieved, editor2015-06-25.
۲۳. Allen C, Loo JF, Yu S, Kong S, Chan T-F. Monitoring bacterial growth using tunable resistive pulse sensing with a pore-based technique. *Applied microbiology and biotechnology*. 2014;98(2):855-62.
۲۴. Kubitschek HE. Cell volume increase in *Escherichia coli* after shifts to richer media. *J Bacteriol*. 1990 Jan;172(1):94-101. PubMed PMID: 2403552. Pubmed Central PMCID: 208405.
۲۵. Chapman MR, Robinson LS, Pinkner JS, Roth R, Heuser J, Hammar M, et al. Role of *Escherichia coli* curli operons in directing amyloid fiber formation. *Science*. 2002;295(5556):851-5.
۲۶. Goris J, Konstantinidis KT, Klappenbach JA, Coenye T, Vandamme P, Tiedje JM. DNA-DNA hybridization values and their relationship to whole-genome sequence similarities. *International journal of systematic and evolutionary microbiology*. 2007;57(1):81-91.
۲۷. Clermont O, Bonacorsi S, Bingen E. Rapid and simple determination of the *Escherichia coli* phylogenetic group. *Applied and environmental microbiology*. 2000;66(10):4555-8.
۲۸. Cai JC, Zhang R, Hu YY, Zhou HW, Chen G-X. Emergence of *Escherichia coli* sequence type 131 isolates producing KPC-2 carbapenemase in China. *Antimicrobial agents and chemotherapy*. 2014;58(2):1146-52.
۲۹. Parry S, Palmer S. *E. coli: environmental health issues of VTEC O157*: Spon Press; 2002.
۳۰. Kaper JB, Nataro JP, Mobley HL. Pathogenic *Escherichia coli*. *Nature Reviews Microbiology*. 20۰۴-۱۲۳:(۲)۲:۰۴
۳۱. Kumarasamy KK, Toleman MA, Walsh TR, Bagaria J, Butt F, Balakrishnan R, et al. Emergence of a new antibiotic resistance mechanism in India, Pakistan, and the UK: a molecular, biological, and epidemiological study. *The Lancet infectious diseases*. 2010;10(9):597-602.
۳۲. Bidet P, Mahjoub-Messai F, Blanco J, Blanco J, Dehem M, Aujard Y, et al. Combined multilocus sequence typing and O serogrouping distinguishes *Escherichia coli* subtypes associated with infant urosepsis and/or meningitis. *Journal of infectious diseases*. 2007;196(2):297-303.

- . ٣٣ Lloyd AL, Rasko DA, Mobley HL. Defining genomic islands and uropathogen-specific genes in uropathogenic *Escherichia coli*. *Journal of bacteriology*. 2007;189(9):3532-46.
- . ٣٤ C. B. Antibiotic susceptibility testing. *Methods Mol Med*. 2005;67(6):89-106.
- . ٣٥ Cheasty T SHRB, Sahm DF, Weissfeld AS, Trevino EA. *Bailey and Scott's diagnostic microbiology*. 12th ed ed. St. Louis: Mosby2013.
- . ٣٦ Winn WC, Koneman EW. *Koneman's color atlas and textbook of diagnostic microbiology*: Lippincott williams & wilkins; 2006.
- . ٣٧ Tlaskalová-Hogenová H, Štěpánková R, Kozáková H, Hudcovic T, Vannucci L, Tučková L, et al. The role of gut microbiota (commensal bacteria) and the mucosal barrier in the pathogenesis of inflammatory and autoimmune diseases and cancer: contribution of germ-free and gnotobiotic animal models of human diseases. *Cellular & molecular immunology*. 2011;8(2):110-20.
- . ٣٨ Stehr-Green JK, Control CfD, Prevention, Health Nlo. *Foodborne disease outbreak investigation: epidemiologic case studies*. Foodborne disease outbreak investigation: epidemiologic case studies: Department of Health & Human Services; 2000.
- . ٣٩ Yan F, Polk DB. Commensal bacteria in the gut: learning who our friends are. *Current opinion in gastroenterology*. 2004;20(6):565-71.
- . ٤٠ Foxman B. Epidemiology of urinary tract infections: incidence, morbidity, and economic costs. *The American journal of medicine*. 2002;113(1):5-13.
- . ٤١ Gupta K, Hooton TM, Stamm WE. Increasing antimicrobial resistance and the management of uncomplicated community-acquired urinary tract infections. *Annals of internal medicine*. 2001;135(1):41-50.
- . ٤٢ Nicolle LE. Epidemiology of urinary tract infections. *Clinical Microbiology Newsletter*. 2002;24(18):135-40.
- . ٤٣ Kucheria R ,Dasgupta P, Sacks S, Khan M, Sheerin N. Urinary tract infections: new insights into a common problem. *Postgraduate medical journal*. 2005;81(952):83.
- . ٤٤ Kulkarni R, Dhakal BK, Slechta ES, Kurtz Z, Mulvey MA, Thanassi DG. Roles of putative type II secretion and type IV pilus systems in the virulence of uropathogenic *Escherichia coli*. *PLoS One*. 2009;4(3):e4752.
- . ٤٥ Pitout JD, Laupland KB, Church DL, Menard ML, Johnson JR. Virulence factors of *Escherichia coli* isolates that produce CTX-M-type extended-spectrum β -lactamases. *Antimicrobial agents and chemotherapy*. 2005;49(11):4667-70.
- . ٤٦ Ewers C, Li G, Wilking H, Kießling S, Alt K, Antão E-M, et al. Avian pathogenic, uropathogenic, and newborn meningitis-causing *Escherichia coli*: how closely related are they ?*International Journal of Medical Microbiology*. 2007;297(3):163-76.
- . ٤٧ Eto DS, Jones TA, Sundsbak JL, Mulvey MA. Integrin-mediated host cell invasion by type 1–piliated uropathogenic *Escherichia coli*. *PLoS Pathog*. 2007;3(7):e100.
- . ٤٨ Bower JM, Eto DS, Mulvey MA. Covert operations of uropathogenic *Escherichia coli* within the urinary tract. *Traffic*. 2005;6(1):18-31.

- .۴۹ Merritt ME, Donaldson JR. Effect of bile salts on the DNA and membrane integrity of enteric bacteria. *Journal of medical microbiology*. 20.۴۱-۱۵۳۳:(۱۲)۵۸;۰۹
- .۵۰ Nataro JP, Kaper JB. Diarrheagenic *Escherichia coli*. *Clinical microbiology reviews*. 1998;11(1):142-201.
- .۵۱ Gaastra W, Svennerholm A-M. Colonization factors of human enterotoxigenic *Escherichia coli* (ETEC). *Trends in microbiology*. 1.۵۲-۴۴۴:(۱۱)۴;۹۹۶
- .۵۲ Wolf MK. Occurrence, distribution, and associations of O and H serogroups, colonization factor antigens, and toxins of enterotoxigenic *Escherichia coli*. *Clinical microbiology reviews*. 1997;10(4):569-84.
- .۵۳ Zhang W. Perspective of use of vaccines for preventing enterotoxigenic *Escherichia coli* diarrhea in humans. *Pathogenic Escherichia coli: molecular and cellular microbiology*: Caister Academic Press Norfolk, UK; 2014. p. 273-302.
- .۵۴ Anantha RP, McVeigh AL, Lee LH, Agnew MK, Cassels FJ, Scott DA, et al. Evolutionary and functional relationships of colonization factor antigen i and other class 5 adhesive fimbriae of enterotoxigenic *Escherichia coli*. *Infection and immunity*. 2004;72(12):7190-201.
- .۵۵ Svennerholm A-M, Tobias J. Vaccines against enterotoxigenic *Escherichia coli*. *Expert review of vaccines*. 2008;7(6):795-804.
- .۵۶ Boedeker EC. Vaccines for enterotoxigenic *Escherichia coli*: current status. *Current opinion in gastroenterology*. 2005;21(1):15-9.
- .۵۷ Zhang W, Sack DA. Progress and hurdles in the development of vaccines against enterotoxigenic *Escherichia coli* in humans. *Expert review of vaccines*. 2012;11(6):677-94.
- .۵۸ Le Bouguénec C. Adhesins and invasins of pathogenic *Escherichia coli*. *International journal of medical microbiology*. 2005;295(6):471-8.
- .۵۹ Hannan TJ, Mysorekar IU, Chen SL, Walker JN, Jones JM, Pinkner JS, et al. LeuX tRNA-dependent and-independent mechanisms of *Escherichia coli* pathogenesis in acute cystitis. *Molecular microbiology*. 2008;67(1):116-28.
- .۶۰ Bien J, Sokolova O, Bozko P. Role of uropathogenic *Escherichia coli* virulence factors in development of urinary tract infection and kidney damage. *International journal of nephrology*. 2012;2012.
- .۶۱ Leffler H, Svanborg-Eden C. Glycolipid receptors for uropathogenic *Escherichia coli* on human erythrocytes and uroepithelial cells. *Infection and immunity*. 1981;34(3):920-9.
- .۶۲ Väisänen V, Tallgren L, Mäkelä PH, Källenius G, Hultberg H, Elo J, et al. Mannose-resistant haemagglutination and P antigen recognition are characteristic of *Escherichia coli* causing primary pyelonephritis. *The Lancet*. 1981;318(8260):1366-9.
- .۶۳ Plos K, Connell H, Jodal U, Marklund B-I, Mårild S, Wettergren B, et al. Intestinal carriage of P fimbriated *Escherichia coli* and the susceptibility to urinary tract infection in young children. *Journal of Infectious Diseases*. 1995;171(3):625-31.

٦٤. Namba K, Yamashita I, Vonderviszt F. Structure of the core and central channel of bacterial flagella. *Nature*. 1989;342(6250):648-54.
٦٥. Sourjik V, Wingreen NS. Responding to chemical gradients: bacterial chemotaxis. *Current opinion in cell biology*. 2012;24(2):262-8.
٦٦. Rossez Y, Holmes A, Wolfson EB, Gally DL, Mahajan A, Pedersen HL, et al. Flagella interact with ionic plant lipids to mediate adherence of pathogenic *Escherichia coli* to fresh produce plants. *Environmental microbiology*. 2014;16(7):2181-95.
٦٧. Haiko J, Westerlund-Wikstrom B. The role of the bacterial flagellum in adhesion and virulence. *Biology (Basel)*. 2013;2(4):1242-67. PubMed PMID: 24٨٣٣٢٢٣ Pubmed Central PMCID: 4009794.
٦٨. Anderson GG, Goller CC, Justice S, Hultgren SJ, Seed PC. Polysaccharide capsule and sialic acid-mediated regulation promote biofilm-like intracellular bacterial communities during cystitis. *Infection and immunity* . ٧٥-٩٦٣:(٣)٧٨;٢٠١٠.
٦٩. Corbett D, Roberts IS. Capsular polysaccharides in *Escherichia coli*. *Adv Appl Microbiol*. 2008;65:1-26.
٧٠. Murray P, Holmes B, Auken H. *Citrobacter*, *Klebsiella*, *Enterobacter*, *Serratia*, and other *Enterobacteriaceae*. *Topley and Wilson's Microbiology and Microbial Infections*. 2005;2:1474-507.
٧١. Isidean SD RM, Savarino SJ, Porter CK A systematic review of ETEC epidemiology focusing on colonization factor and toxin expression. *vaccine*. 2011;29:6167-78. Pubmed Central PMCID: 21723899.
٧٢. von Mentzer A CT, Wieler LH, Semmler T, Iguchi A, et al. *Nat Genet*. Identification of enterotoxigenic *Escherichia coli* (ETEC) clades with long-term global distribution. *Nat Genet*. 2014.
٧٣. Gyles CL. Shigatoxin-producing *Escherichiacoli*: an overview .*J AnimSci*. 2007;85:E45-E62.
٧٤. Römer W, Berland L, Chambon V, Gaus K, Windschiegl B, Tenza D, et al. Shiga toxin induces tubular membrane invaginations for its uptake into cells. *Nature*. 2007;450(7170):670-5.
٧٥. D. E. Kohan. "Role of endothelin and tumour necrosis factor in the renal response to sepsis, . *Nephrology Dialysis Transplantation*. 1994;9(4):73-7.
٧٦. Bister B ea. The structure of salmochelins: C-glucosylated enterobactins of *Salmonella enterica*. *Biometals* 2004;17:471-81. Pubmed Central PMCID : [١٥٢٥٩٣٦٩
٧٧. U. Dobrindt and J. Hacker, K. G. Naber, A. J. Schaeffer, C., F. Heyns TM, D. A. Shoskes, and T. E. B. Johansen, . *Uropathogenes and virulence factors," in Urogenital Infections*. European Association of Urology, Arnhem, The Netherlands. 2010. ٢٢-٤:
٧٨. A. J. Schaeffer and E. M. Schaeffer AJW, L. R. Kavoussi,, A. C. Novick AWP, and C. A. Peters, . *Infections of the urinary tract," in Campbell-Walsh Urology*, 2012.
٧٩. Nicolle LE. Urinary tract infection in geriatric and institutionalized patients . *Current opinion in Urology*. 2002;12(1):51-5.

- .٨٠ Al-Hasan MN, Eckel-Passow JE, Baddour LM. Bacteremia complicating gram-negative urinary tract infections: a population-based study. *Journal of Infection*. 2010;60(4):278-85.
- .٨١ Marrazzo JM. Mucopurulent cervicitis: no longer ignored, but still misunderstood. *Infectious disease clinics of North America*. 2005;19(2):333-49.
- .٨٢ Fleming A. On the Antibacterial Action of Cultures of a Penicillium, with Special Reference to Their Use in the Isolation of B. influenzae. *Reviews of infectious diseases*. 1980:129-39.
- .٨٣ Castanon J. History of the use of antibiotic as growth promoters in European poultry feeds. *Poultry science*. 2007;86(11):2466-71.
- .٨٤ Cheng Q, Wang S, Salyers A. New approaches for anti-infective drug discovery: antibiotics, vaccines and beyond. *Current Drug Targets-Infectious Disorders*. 2003;3(1):65-76.
- .٨٥ Waksman SA. The role of antibiotics in nature. *Perspectives in biology and medicine*. 1961;4(3):271-87.
- .٨٦ https://www.pinterest.com/pin/380272_٧٩٢٢٩٣٧٩٤٨١٢
- .٨٧ Miller MT, Bachmann BO, Townsend CA, Rosenzweig AC. Structure of β -lactam synthetase reveals how to synthesize antibiotics instead of asparagine. *Nature Structural & Molecular Biology*. 2001;8(8):684-9.
- .٨٨ J Wolter D, D Lister P. Mechanisms of β -lactam resistance among *Pseudomonas aeruginosa*. *Current pharmaceutical design*. 2013;19(2):209-22.
- .٨٩ Breilh D, Texier-Maugein J, Allaouchiche B, Saux MC, Boselli E. Carbapenems. *J Chemother*. 2013 Feb;25(1):1-17. PubMed PMID: 23433439.
- .٩٠ García-Estrada C, Fierro F, Martín J-F. Evolution of fungal β -lactam biosynthesis gene clusters. *Current Research, Technology and Education Topics in Applied Microbiology and Microbial Biotechnology*. 2010;1:577-88.
- .٩١ <http://www.mdpi.com/2079-6382/3/2/128/htm>.
- .٩٢ Pacifici GM. Pharmacokinetics of cephalosporins in the neonate: a review. *Clinics*. 2011;66(7):1267-74.
- .٩٣ Mosby's drug consult. 16 ed ed: msby,Inc; 2006.
- .٩٤ AHFS DRUG INFORMATION. 2006 ed ed: American Society of Health-System Pharmacists; 2006.
- .٩٥ Majiduddin FK, Materon IC, Palzkill TG. Molecular analysis of beta-lactamase structure and function. *International journal of medical microbiology*. 2002;292(2):127-37.
- .٩٦ Torres JA, Villegas MV, Quinn JP. Current concepts in antibiotic-resistant gram-negative bacteria. *Expert review of anti-infective therapy*. 2007;5(5):833-43.
- .٩٧ Bradley J, Garau J, Lode H, Rolston K, Wilson S, Quinn J. Carbapenems in clinical practice: a guide to their use in serious infection. *International journal of antimicrobial agents*. 1999;11(2):93-100.
- .٩٨ Paterson DL, editor Serious infections caused by enteric gram-negative bacilli--mechanisms of antibiotic resistance and implications for therapy of gram-negative sepsis in the transplanted patient. *Seminars in respiratory infections*; 2002.

۹۹. Paterson D. Recommendation for treatment of severe infections caused by Enterobacteriaceae producing extended-spectrum β -lactamases (ESBLs). *Clinical Microbiology and Infection*. 2000;6(9):460-3.
۱۰۰. Paterson DL, Bonomo RA. Extended-spectrum β -lactamases: a clinical update. *Clinical microbiology reviews*. 2005;18(4):657-86.
۱۰۱. Nicolau DP. Carbapenems: a potent class of antibiotics. *Expert opinion on pharmacotherapy*. 2008;9(1):23-37.
۱۰۲. Papp-Wallace KM, Endimiani A, Taracila MA, Bonomo RA. Carbapenems: past, present, and future. *Antimicrobial agents and chemotherapy*. 2011;55(11):4943-60.
۱۰۳. Parker WL, RATHNUM ML, WELLS JJS, TREJO WH, PRINCIPE PA, SYKES RB. SQ 27,860, a simple carbapenem produced by species of *Serratia* and *Erwinia*. *The Journal of antibiotics*. 1982;35(6):653-60.
۱۰۴. Tsuji N, NAGASHIMA K, KOBAYASHI M, TERUI Y, MATSUMOTO K, KONDO E. The structures of pluracidomycins, new carbapenem antibiotics. *The Journal of antibiotics*. 1982;35(4):536-40.
۱۰۵. Moellering RC, Eliopoulos GM, Sentochnik DE. The carbapenems: new broad spectrum β -lactam antibiotics. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. 1989;24(suppl A):1-7.
۱۰۶. https://www.researchgate.net/figure/271206722_fig1_Figure-1-Chemical-structures-of-the-carbapenems-ertapenem-meropenem-imipenem-and.
۱۰۷. Bassetti M, Nicolini L, Esposito S, Righi E, Viscoli C. Current status of newer carbapenems. *Current medicinal chemistry*. 2009;16(5):564-75.
۱۰۸. HASHIZUME T, ISHINO F, NAKAGAWA J-I, TAMAKI S, MATSUHASHI M. Studies on the mechanism of action of imipenem (N-formimidoylthienamycin) in vitro: binding to the penicillin-binding proteins (PBPs) in *Escherichia coli* and *Pseudomonas aeruginosa*, and inhibition of enzyme activities due to the PBPs in *E. coli*. *The Journal of antibiotics*. ۴۰۰-۳۹۴:(۴)۳۷;۱۹۸۴.
۱۰۹. Paterson DL. Resistance in gram-negative bacteria: Enterobacteriaceae. *The American journal of medicine*. 2006;119(6):S20-S8.
۱۱۰. Livermore DM. Has the era of untreatable infections arrived? *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* ۶۴;۲۰۰۹.(suppl 1):i29-i36.
۱۱۱. Yang K, Guglielmo BJ. Diagnosis and Treatment of Extended-Spectrum and AmpC β -Lactamase—Producing Organisms. *Annals of Pharmacotherapy*. 2007;41(9):1427-35.
۱۱۲. Zhanel GG, Wiebe R, Dilay L, Thomson K, Rubinstein E, Hoban DJ ,et al. Comparative review of the carbapenems. *Drugs*. 2007;67(7):1027-52.
۱۱۳. Dedhia HV, McKnight R. Doripenem: position in clinical practice. *Expert review of anti-infective therapy*. 2009;7(5):507-14.
۱۱۴. Nagaraj S, Chandran S, Shamanna P, Macaden R. Carbapenem resistance among *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* in a tertiary care hospital in south India. *Indian journal of medical microbiology*. 2012;30(1):93.
۱۱۵. Masaali M, Faraji T, Ramazanzadeh R. Risk Factors Associated with Resistance in Metallo β -lactamase Producing Enterobacteriaceae Isolated from Patients in Sanandaj Hospitals. *Current Drug Therapy*. 2012;7(3):179-83.

- . ١١٩ Little ML, Qin X, Zerr DM, Weissman SJ. Molecular diversity in mechanisms of carbapenem resistance in paediatric Enterobacteriaceae. International journal of antimicrobial agents. 2012;39(1):52-7.
- . ١١٧ Morita Y, Tomida J, Kawamura Y. MexXY multidrug efflux system of *Pseudomonas aeruginosa*. Frontiers in microbiology. 2012;3:408.
- . ١١٨ Meroueh SO, Bencze KZ, Hessek D, Lee M, Fisher JF, Stemmler TL, et al. Three-dimensional structure of the bacterial cell wall peptidoglycan. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. 2006;103(12):4404-9.
- . ١١٩ Zagorianou A, Sianou E, Isoifidis E, Dimou V, Protonotariou E, Miyakis S, et al. Microbiological and molecular characteristics of carbapenemase-producing *Klebsiella pneumoniae* endemic in a tertiary Greek hospital during 2004-2010. 2012.
- . ١٢٠ Carattoli A, Aschbacher R, March A, Larcher C, Livermore DM, Woodford N. Complete nucleotide sequence of the IncN plasmid pKOX105 encoding VIM-1, QnrS1 and SHV-12 proteins in Enterobacteriaceae from Bolzano, Italy compared with IncN plasmids encoding KPC enzymes in the USA. Journal of antimicrobial chemotherapy. 2010;65(10):2070-5.
- . ١٢١ Samuelsen Ø, Buarø L, Giske CG, Simonsen GS, Aasnæs B, Sundsfjord A. Evaluation of phenotypic tests for the detection of metallo- β -lactamase-producing *Pseudomonas aeruginosa* in a low prevalence country. Journal of antimicrobial chemotherapy. 2008;61(4):827-30.
- . ١٢٢ Rodriguez-Martinez JM, Poirel L, Nordmann P. Molecular epidemiology and mechanisms of carbapenem resistance in *Pseudomonas aeruginosa*. Antimicrob Agents Chemother. 2009 Nov;53(11):4783-8. PubMed PMID: 19738025. Pubmed Central PMCID: 2772299.
- . ١٢٣ Queenan AM, Bush K. Carbapenemases: the versatile β -lactamases. Clinical microbiology reviews. 2007;20(3):440-58.
- . ١٢٤ Naas T, Nordmann P. Analysis of a carbapenem-hydrolyzing class A beta-lactamase from *Enterobacter cloacae* and of its LysR-type regulatory protein. Proceedings of the National Academy of Sciences. 1994;91(16):7693-7.
- . ١٢٥ Yigit H, Queenan AM, Anderson GJ, Domenech-Sanchez A, Biddle JW, Steward CD, et al. Novel carbapenem-hydrolyzing β -lactamase, KPC-1, from a carbapenem-resistant strain of *Klebsiella pneumoniae*. Antimicrobial agents and chemotherapy. 2001;45(4):1151-61.
- . ١٢٦ Bush K, Jacoby GA. Updated functional classification of β -lactamases. Antimicrobial agents and chemotherapy. 2010;54(3):969-76.
- . ١٢٧ Moayednia R, Shokri D, Mobasherizadeh S, Baradaran A, Fatemi SM, Merrikhi A. Frequency assessment of β -lactamase enzymes in *Escherichia coli* and *Klebsiella* isolates in patients with urinary tract infection. Journal of research in medical sciences: the official journal of Isfahan University of Medical Sciences. 2014;19(Suppl 1):S41.
- . ١٢٨ Miriagou V, Cornaglia G, Edelstein M, Galani I, Giske C, Gniadkowski M, et al. Acquired carbapenemases in Gram-negative bacterial pathogens: detection and surveillance issues. Clinical microbiology and infection. 2010;16(2):112-22.

- . ١٢٩ Galleni M, Lamotte-Brasseur J, Rossolini GM, Spencer J, Dideberg O, Frère J-M. Standard numbering scheme for class B β -lactamases. *Antimicrobial agents and chemotherapy*. 2001;45(3):660-3.
- . ١٣٠ Garau G, García-Sáez I, Bebrone C, Anne C, Mercuri P, Galleni M, et al. Update of the standard numbering scheme for class B β -lactamases. *Antimicrobial agents and chemotherapy*. 2004;48(7):2347-9.
- . ١٣١ Crowder MW, Spencer J, Vila AJ. Metallo- β -lactamases: novel weaponry for antibiotic resistance in bacteria. *Accounts of chemical research*. 2006;39(10):721-8.
- . ١٣٢ Cornaglia G, Giamarellou H, Rossolini GM. Metallo- β -lactamases: a last frontier for β -lactams? *The Lancet infectious diseases*. 2011;11(5):381-9.
- . ١٣٣ El Garch F, Bogaerts P, Bebrone C, Galleni M, Glupczynski Y. OXA-198, an acquired carbapenem-hydrolyzing class D β -lactamase from *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrobial agents and chemotherapy*. 2011;55(10):4828-33.
- . ١٣٤ Poirel L, Weldhagen GF, Naas T, De Champs C, Dove MG, Nordmann P. GES-2, a Class A β -Lactamase from *Pseudomonas aeruginosa* with Increased Hydrolysis of Imipenem. *Antimicrobial agents and chemotherapy*. 2001;45(9):2598-603.
- . ١٣٥ Villegas MV, Lolans K, Correa A, Kattan JN, Lopez JA, Quinn JP, et al. First identification of *Pseudomonas aeruginosa* isolates producing a KPC-type carbapenem-hydrolyzing β -lactamase. *Antimicrobial agents and chemotherapy*. 2007;51(4):1553-5.
- . ١٣٦ Johnson AP, Woodford N. Global spread of antibiotic resistance: the example of New Delhi metallo- β -lactamase (NDM)-mediated carbapenem resistance. *Journal of medical microbiology*. 2013;62(4):499-513.
- . ١٣٧ Franklin C, Liolios L, Peleg AY. Phenotypic detection of carbapenem-susceptible metallo- β -lactamase-producing gram-negative bacilli in the clinical laboratory. *Journal of clinical microbiology*. 2006;44(9):3139-44.
- . ١٣٨ Peleg AY, Franklin C, Bell JM, Spelman DW. Dissemination of the metallo- β -lactamase gene blaIMP-4 among gram-negative pathogens in a clinical setting in Australia. *Clinical infectious diseases*. 2005;41(11):1549-56.
- . ١٣٩ Chen Y, Zhou Z, Jiang Y, Yu Y. Emergence of NDM-1-producing *Acinetobacter baumannii* in China. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. 2011;66(6):1255-9.
- . ١٤٠ Zeng X, Lin J. Beta-lactamase induction and cell wall metabolism in Gram-negative bacteria. *Frontiers in microbiology*. 2013;4:128.
- . ١٤١ Chuma T, Miyasako D, Hesham D, Takayama T, Nakamoto Y, Shahada F, et al. Chronological change of resistance to β -lactams in *Salmonella enterica* serovar Infantis isolated from broilers in Japan. *Frontiers in microbiology*. 2013;4:113.
- . ١٤٢ Albiger B, Glasner C, Struelens MJ, Grundmann H, Monnet DL. Carbapenemase-producing Enterobacteriaceae in Europe: assessment by national experts from 38 countries, May 2015. *Euro Surveill*. 2015;20(45). PubMed PMID: 26675038. Epub 2015/12/18. Eng.
- . ١٤٣ Perez-Llarena FJ, Bou G. β -Lactamase inhibitors: the story so far. *Current medicinal chemistry*. 2009;16(28):3740-65.
- . ١٤٤ Drawz SM, Bonomo RA. Three decades of β -lactamase inhibitors. *Clinical microbiology reviews*. 2010;23(1):160-201.

١٤٥. Jamal W, Rotimi VO, Albert MJ, Khodakhast F, Nordmann P, Poirel L. High prevalence of VIM-4 and NDM-1 metallo- β -lactamase among carbapenem-resistant Enterobacteriaceae. *Journal of medical microbiology*. 2013;62(8):1239-44.
١٤٦. Nahid F, Khan AA, Rehman S, Zahra R. Prevalence of metallo- β -lactamase NDM-1-producing multi-drug resistant bacteria at two Pakistani hospitals and implications for public health. *Journal of infection and public health*. 2013;6(6):487-93.
١٤٧. Bora A, Sanjana R, Jha BK, Mahaseth SN, Pokharel K. Incidence of metallo-beta-lactamase producing clinical isolates of *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* in central Nepal. *BMC research notes*. 2014;7(1):1.
١٤٨. Walsh TR. New Delhi metallo- β -lactamase-1: detection and prevention. *Canadian Medical Association Journal*. 2011;183(11):1240-1.
١٤٩. Walsh TR, Tolereman, M.A. Metallo β -lactamase: The quiet before the storm. *Clinical Microbiological Review* 2005;18:306-25.
١٥٠. Koh T, Babini G, Woodford N, Sng L, Hall L, Livermore D. Carbapenem-hydrolysing IMP-1 β -lactamase in *Klebsiella pneumoniae* from Singapore. *The Lancet*. 1999;353(9170):2162.
١٥١. Arya SC, Agarwal N. International travel with acquisition of multi-drug resistant Gram negative bacteria containing the New Delhi metallo-beta-lactamase gene, bla NDM-1. *Travel medicine and infectious disease*. 2011;9(1):47-8.
١٥٢. Yong D, Toleman MA, Giske CG, Cho HS, Sundman K, Lee K, et al. Characterization of a new metallo- β -lactamase gene, blaNDM-1, and a novel erythromycin esterase gene carried on a unique genetic structure in *Klebsiella pneumoniae* sequence type 14 from India. *Antimicrobial agents and chemotherapy*. 2009;53(12):5046-54.
١٥٣. Nordmann P. Carbapenemase-producing Enterobacteriaceae: overview of a major public health challenge. *Médecine et maladies infectieuses*. 2014;44(2):51-6.
١٥٤. Kim Y, Tesar C, Mire J, Jedrzejczak R, Binkowski A, Babnigg G, et al. Structure of apo- and monometalated forms of NDM-1—a highly potent carbapenem-hydrolyzing metallo- β -lactamase. *PLoS One*. 2011;6(9):e24621.
١٥٥. Espinal P, Fugazza G, Lopez Y, Kasma M, Lerman Y, Malhotra-Kumar S, et al. Dissemination of an NDM-2-producing *Acinetobacter baumannii* clone in an Israeli rehabilitation center. *Antimicrobial agents and chemotherapy*. 2011;55(11):5396-8.
١٥٦. Kaase M, Nordmann P, Wichelhaus TA, Gatermann SG, Bonnin RA, Poirel L. NDM-2 carbapenemase in *Acinetobacter baumannii* from Egypt. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. 2011:dkr135.
١٥٧. Nordmann P, Boulanger AE, Poirel L. NDM-4 metallo- β -lactamase with increased carbapenemase activity from *Escherichia coli*. *Antimicrobial agents and chemotherapy*. 2012;56(4):2184-6.
١٥٨. Hornsey M, Phee L, Wareham DW. A novel variant, NDM-5, of the New Delhi metallo- β -lactamase in a multidrug-resistant *Escherichia coli* ST648 isolate recovered from a patient in the United Kingdom. *Antimicrobial agents and chemotherapy*. 2011;55(12):5952-4.
١٥٩. Williamson DA, Sidjabat HE, Freeman JT, Roberts SA, Silvey A, Woodhouse R, et al. Identification and molecular characterisation of New Delhi metallo- β -

- lactamase-1 (NDM-1)-and NDM-6-producing Enterobacteriaceae from New Zealand hospitals. *International journal of antimicrobial agents*. 2012;39(6):529-33.
۱۶۰. Carbapenemases CA. Global spread of carbapenemase-producing Enterobacteriaceae. 2011.
۱۶۱. Poirel L, Dortet L, Bernabeu S, Nordmann P. Genetic features of blaNDM-1-positive Enterobacteriaceae. *Antimicrobial Agents and chemotherapy*. 2011;55(11):5403-7.
۱۶۲. Wang J-F, Chou K-C. Insights from modeling the 3D structure of New Delhi metallo- β -lactamase and its binding interactions with antibiotic drugs. *PLoS One*. 2011;6(4):e18414.
۱۶۳. F. Fallah AT, M. H. Vala, and A. Hashemi,. Global spread of New Delhi metallo-beta-lactamase-1(NDM-1). *Iranian Journal of Clinical Infectious Diseases*. 2011;6(4):171-7.
۱۶۴. Chen LF, Anderson DJ, Paterson DL. Overview of the epidemiology and the threat of *Klebsiella pneumoniae* carbapenemases (KPC) resistance. *Infection and drug resistance*. 2۰۱۳;۵:۱۳۳-۱۴۲.
۱۶۵. Kitchel B, Rasheed JK, Patel JB, Srinivasan A, Navon-Venezia S, Carmeli Y, et al. Molecular epidemiology of KPC-producing *Klebsiella pneumoniae* isolates in the United States: clonal expansion of multilocus sequence type 258. *Antimicrobial agents and chemotherapy*. 2009;53(8):3365-70.
۱۶۶. Nordmann P, Cuzon G, Naas T. The real threat of *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase-producing bacteria. *The Lancet infectious diseases*. 2009;9(4):228-36.
۱۶۷. Curiao T, Morosini MI, Ruiz-Garbajosa P, Robustillo A, Baquero F, Coque TM, et al. Emergence of blaKPC-3-Tn4401a associated with a pKPN3/4-like plasmid within ST384 and ST388 *Klebsiella pneumoniae* clones in Spain. *Journal of antimicrobial chemotherapy*. 2010;65(8):1608-14.
۱۶۸. Naas T, Cuzon G, Villegas M-V, Lartigue M-F, Quinn JP, Nordmann P. Genetic structures at the origin of acquisition of the β -lactamase blaKPC gene. *Antimicrobial agents and chemotherapy*. 2008;52(4):1257-63.
۱۶۹. Evans BA, Amyes SG. OXA beta-lactamases. *Clin Microbiol Rev*. 2014 Apr;27(2):241-63. PubMed PMID: 24696435. Pubmed Central PMCID: 3993105.
۱۷۰. Gupta V. Metallo beta lactamases in *Pseudomonas aeruginosa* and *Acinetobacter* species. *Expert opinion on investigational drugs*. 2008;17(2):131-43.
۱۷۱. Rieber H, Frontzek A, von Baum H, Pfeifer Y. Emergence of metallo- β -lactamases GIM-1 and VIM in multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* in North Rhine–Westphalia, Germany. *Journal of antimicrobial chemotherapy*. 2012;dkr579.
۱۷۲. Hamprecht A, Poirel L, Göttig S, Seifert H, Kaase M, Nordmann P. Detection of the carbapenemase GIM-1 in *Enterobacter cloacae* in Germany. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. 2012;dks447.
۱۷۳. Castanheira M, Toleman MA, Jones RN, Schmidt FJ, Walsh TR. Molecular characterization of a β -lactamase gene, blaGIM-1, encoding a new subclass of metallo- β -lactamase. *Antimicrobial agents and chemotherapy*. 2004;48(12):4654-61.

۱۷۴. Kaase M PN, Szabados F, Gatermann S. First description of the metallo-beta-lactamase GIM-1 in *Acinetobacter pittii* (formerly *Acinetobacter genomospecies 3*), abstr P-1680. Abstr. 22nd Eur. Congr. In: ECCMID, editor. ClinMicrobiol Infect Dis London, United Kingdom 2012.
۱۷۵. Rieber H, Frontzek A, Pfeifer Y. Emergence of metallo- β -lactamase GIM-1 in a clinical isolate of *Serratia marcescens*. Antimicrobial agents and chemotherapy. 2012;56(9):4945-7.
۱۷۶. Falagas ME, Lourida P, Poulikakos P, Rafailidis PI, Tansarli GS. Antibiotic treatment of infections due to carbapenem-resistant Enterobacteriaceae: systematic evaluation of the available evidence. Antimicrobial agents and chemotherapy. 2013;AAC. 01222-13.
۱۷۷. Petrosillo N, Ioannidou E, Falagas M. Colistin monotherapy vs. combination therapy: evidence from microbiological, animal and clinical studies. Clinical Microbiology and Infection. 2008;1۷-۸۱۶:(۹)۴
۱۷۸. Daikos GL, Markogiannakis A, Souli M, Tzouveleki LS. Bloodstream infections caused by carbapenemase-producing *Klebsiella pneumoniae*: a clinical perspective. Expert Rev Anti Infect Ther. 2012 Dec;10(12):1393-404. PubMed PMID: 23253318.
۱۷۹. Tzouveleki LS, Markogiannakis A, Psychogiou M, Tassios PT, Daikos GL. Carbapenemases in *Klebsiella pneumoniae* and other Enterobacteriaceae: an evolving crisis of global dimensions. Clin Microbiol Rev. 2012 Oct;25(4):682-707. PubMed PMID: 23034326. Pubmed Central PMCID: 3485753.
۱۸۰. Zusman O, Avni T, Leibovici L, Adler A, Friberg L, Stergiopoulou T, et al. Systematic review and meta-analysis of in vitro synergy of polymyxins and carbapenems. Antimicrobial agents and chemotherapy. 2013;57(10):5104-11.
۱۸۱. Shahcheraghi F, Nobari S, Rahmati Ghezelgeh F, Nasiri S, Owlia P, Nikbin VS, et al. First report of New Delhi metallo-beta-lactamase-1-producing *Klebsiella pneumoniae* in Iran. Microbial Drug Resistance. 2013;19(1):30-6.
۱۸۲. Abdollahi Kheirabadi S, Najafipour S, Kafizadeh F, Abdollahi A, Jafari S, Moravej A. Evaluation of Drug Resistance Pattern of *Escherichia coli* Strains Isolated from Fasa Vali-e-Asr Hospital Patients. Journal of Fasa University of Medical Sciences. 2013;2(4):273-8.
۱۸۳. Agilzadeh SS MH. Study of IMP Type B-Lactamase Gene's Frequency in *Escherichia coli* Isolates Collected from Patients at Educational Hospital (Imam Reza and Shohada), Tabriz, 2013. Med J Tabriz Uni Med Sciences Health Services. 2016;38(1):56-61.
۱۸۴. Vali P, Shahcheraghi F, Seyfipour M, Zamani MA, Allahyar MR, Feizabadi MM. Phenotypic and genetic characterization of carbapenemase and ESBLs producing gram-negative bacteria (GNB) isolated from patients with cystic fibrosis (CF) in Tehran hospitals. Journal of clinical and diagnostic research: JCDR. 2014;8(1):26.
۱۸۵. Dortet L, Poirel L, Al Yaqoubi F, Nordmann P. NDM-1, OXA-48 and OXA-181 carbapenemase-producing Enterobacteriaceae in Sultanate of Oman. Clinical Microbiology and Infection. 2012;18(5):E144-E8.

- ۱۸۶ Bhaskar MM, Anand R, Harish B. Prevalence of blaNDM-Producing Blood Isolates of *Escherichia Coli*, *Klebsiella* species and *Enterobacter* Species in a Tertiary Care Centre in South India. 2013.
- ۱۸۷ Ma L, Siu LK, Lin J-C, Wu T-L, Fung C-P, Wang J-T, et al. Updated molecular epidemiology of carbapenem-non-susceptible *Escherichia coli* in Taiwan: first identification of KPC-2 or NDM-1-producing *E. coli* in Taiwan. *BMC infectious diseases*. 2013;13(1):1.
- ۱۸۸ Enwuru N, Enwuru C, Ogonnia S, Adepoju-Bello A. Metallo- β -lactamase production by *Escherichia coli* and *Klebsiella* Species isolated from hospital and community subjects in Lagos, Nigeria. *Nat Sci*. 2011;9(11):1-5.
- ۱۸۹ Rahman M, Shukla SK, Prasad KN, Ovejero CM, Pati BK, Tripathi A, et al. Prevalence and molecular characterisation of New Delhi metallo- β -lactamases NDM-1, NDM-5, NDM-6 and NDM-7 in multidrug-resistant *Enterobacteriaceae* from India. *International journal of antimicrobial agents*. 2014;44(1):30-7.
- ۱۹۰ Azim A, Dwivedi M, Rao PB, Baronia A, Singh R, Prasad K, et al. Epidemiology of bacterial colonization at intensive care unit admission with emphasis on extended-spectrum β -lactamase-and metallo- β -lactamase-producing Gram-negative bacteria—an Indian experience. *Journal of medical microbiology*. 2010;59.۶۰-۹۵۵:(۸)
- ۱۹۱ Shibata N, Doi Y, Yamane K, Yagi T, Kurokawa H, Shibayama K, et al. PCR typing of genetic determinants for metallo- β -lactamases and integrases carried by gram-negative bacteria isolated in Japan, with focus on the class 3 integron. *Journal of Clinical Microbiology*. 2003;41(12):5407-13.
- ۱۹۲ Neyestanaki DK, Mirsalehian A, Rezagholizadeh F, Jabalameli F, Taherikalani M, Emameini M. Determination of extended spectrum beta-lactamases, metallo-beta-lactamases and AmpC-beta-lactamases among carbapenem resistant *Pseudomonas aeruginosa* isolated from burn patients. *Burns*. 2014;40(8):1556-61.
- ۱۹۳ Jain A, Mondal R. Prevalence & antimicrobial resistance pattern of extended spectrum [beta]-lactamase producing *Klebsiella* spp isolated from cases of neonatal septicaemia. *Indian Journal of Medical Research*. 2007;125(1):89.
- ۱۹۴ Bratu S, Brooks S, Burney S, Kochar S, Gupta J, Landman D, et al. Detection and spread of *Escherichia coli* possessing the plasmid-borne carbapenemase KPC-2 in Brooklyn, New York. *Clinical infectious diseases*. 2007;44(7):972-5.
- ۱۹۵ ADWAN G, BOURINEE H, OTHMAN S. Prevalence of Metallo- β -lactamases Producing *Escherichia coli* Isolated from North of Palestine. *Journal of Microbiology and Antimicrobial Agents*. 2016;2.(۱)
- ۱۹۶ Moini AS, Soltani B, Ardakani AT, Moravveji A, Erami M, Rezaei MH, et al. Multidrug-Resistant *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* Isolated From Patients in Kashan, Iran. *Jundishapur journal of microbiology*. 2015;8.(۱۰)
- ۱۹۷ Yayan J, Ghebremedhin B, Rasche K. No Development of Imipenem Resistance in Pneumonia Caused by *Escherichia coli*. *Medicine*. 2015;94.(۲۵)
- ۱۹۸ SM M. Frequency of extended spectrum β -Lactamase producing *Enterobacteriaceae* in intensive care units. *Tehran University Medical Journal TUMS Publications*. 2008;65(1):33-8.

.۱۹۹ Peirano G, Bradford PA, Kazmierczak KM, Badal RE, Hackel M, Hoban DJ, et al. Global incidence of carbapenemase-producing *Escherichia coli* ST131. *Emerg Infect Dis.* 2014;20(11):1928-31.

ضمائم

❖ تهیه بافر TBE 10X

۲/۴۲ گرم Tris را در ۱۰ میلی لیتر آب مقطر حل کرده و سپس ۰/۷۴ گرم EDTA به آن اضافه کرده و به آرامی مخلوط کردیم. با کلریدریک اسید یک نرمال pH برابر ۸ شده و در نهایت حجم کلی را به ۱۰۰۰ میلی لیتر می رسانیم.

❖ تهیه بافر TBE 1X

TBE 10X را به نسبت ۱:۱۰ رقیق کرده. که از این TBE بدست آمده در تهیه ژل در تانک الکتروفورز استفاده می کنیم.

❖ پارامترهای مهم در ایجاد شرایط بهینه در انجام PCR

۱- غلظت یون منیزیم (Mg^{2+})

۲- بافر PCR

۳- غلظت dNTP

۴- طراحی پرایمر و غلظت آن

❖ روش لیوفیلیزاسیون

کشت های باکتری ها را می توان تحت شرایط مناسب خشک نمود و تا سالها از آن ها نگهداری نمود. محیط های کشت را به طور سریع در خلاء منجمد کرد و سپس آن ها را از طریق تصعید یخ، خشک می نمایند. عمل تصعید در اتمسفر تحت فشار پایین انجام می گیرد و خشک کننده شیمیایی خاصی به این عمل کمک می کند. مواد خشک شده را تحت شرایط خلاء یا تحت گازی مانند نیتروژن به داخل آمپول هایی انتقال می دهند و از آن ها در محل تاریک در دمای ۵-۴ درجه سانتی گراد تا زمان استفاده نگهداری می کنند.

❖ طرز تهیه محیط نهم مک فارلند

۰/۶ میلی لیتر از محلول ۱٪ باریم کلراید دهیدراته در یک مزور ۱۰۰ میلی لیتری مدرج و رساندن آن به حجم ۱۰۰ میلی لیتر با اسید سولفوریک ۱٪ بدست می آید. باریم سولفات بدست آمده نیم مک فارلند نامیده می شود که با اسپکتروفتومتر OD آن در موج ۶۲۵ نانومتر ۰/۸ تا ۰/۱ می باشد.

✿ طرز تهیه محیط کشت مک کانکی آگار

۲۰ گرم پیتون، ۵ گرم سدیم کلرید، ۱/۵ گرم املاح صفراوی، ۱۰ گرم لاکتوز، ۱۳/۵ گرم آگار، ۰/۰۳ گرم معرف نوترال رد و ۰/۰۰۱ گرم کریستال ویوله را در ۱۰۰۰ میلی لیتر آب مقطر به صورت سوسپانسیون در می آوریم سپس pH سوسپانسیون را تنظیم می کنیم. سوسپانسیون حاصل را در دمای ۱۲۱ درجه سانتی گراد، به مدت ۱۵ دقیقه توسط اتوکلاو استریل می کنیم. در آخر، محیط را تا ۵۰ درجه سانتی گراد سرد کرده و آن را در پلیت استریل می ریزیم.

✿ تعدادی از سوش های استاندارد باکتریایی

- ۱- *Escherichia coli* ATCC 25922
- ۲- *Streptococcus pneumonia* ATCC 6035
- ۳- *Staphylococcus aureus* ATCC 25923
- ۴- *Klebsiella pneumonia* ATCC 13883
- ۵- *Proteus vulgaris* ATCC 33420
- ۶- *Streptococcus agalactiae* ATCC 27956
- ۷- *Haemophilus influenza* ATCC 43065

✿ تست (Methyl Red)MR: تستی برای تعیین نوع محصول نهایی تخمیر که در طی آن لاکتات و دیگر فراورده های اسیدی تولید می شود.

✿ تست (Voges-Proskauer)VP: تستی برای تعیین نوع محصول نهایی تخمیر که در طی آن لاکتات و دیگر فراورده های اسیدی تبدیل به ترکیبات خنثی مثل اتانول، استوئین (۳و۲ بوتان دی ال) می شود.

Background: Infection is a major cause of morbidity and mortality in intensive care units (ICU) worldwide. *Escherichia coli* (*E.coli*) is a common pathogen in ICUs worldwide, Increasing resistance to carbapenems. the emerge of carbapenem resistant *E.coli* has been steadily increased in recent years, resulting in limitation of therapeutic options. The prevalence of *bla*_{NDM-1}, *bla*_{IMP}, *bla*_{AIM} genotypes remain unknown in many region of Iran. The aim of this study were to evaluate the frequency of *bla*_{NDM-1}, *bla*_{IMP}, *bla*_{AIM} genes as a most common genotypes among carbapenem resistant *E. coli* isolated from ICU and susceptibility to tested antibiotics.

Methods: A total of 267 *E. coli* isolates were collected from patients admitted in ICUs of Qazvin, Karaj and Tehran hospitals during 2 years period, and were screened for detection sensitive to every carbapenem disk (i.e imipenem, meropenem, ertapenem) by disk diffusion agar, according to the CLSI guideline 2015, for detection of carbapenemase producing *E.coli* modified hodge test performed by using meropenem disk on Muller Hinton agar(MHT). so for detection Metallo beta lactamase producing *E.coli* used by imipenem disk and imipenem disk plus Ethylene diamine tetra acetic (EDTA) in combine disk method. PCR and sequencing were conducted for detection *bla*_{NDM-1}, *bla*_{IMP}, *bla*_{AIM} of encoding genes.

Results: Out of 267 *E.coli* isolates, 131 isoates were non-sensitive to at least one tested carbapenem disks. Among the 267 *E.coli* isolates, 105(39.32%) isolates were found to be resistant to imipenem with MICs ranging from 4 to >64 µg/ml. Out of 131 isolates, 70(53.43%) isolates have carbapenemase producer by MHT method. out of 131 isolates, 48 isolates(36.64%) have metallo beta lactamase by EDTA combine disk method. in PCR method not reported any *bla*_{NDM-1}, *bla*_{IMP}, *bla*_{AIM}. Conclusion: The results of this study show that the increase growing number of nosocomial infections associated with carbapenem-resistant *E.coli* in these regions leading to difficulties in antibiotic therapy.

Key words: *E.coli*, carbapenemase, ICU



Qazvin University of Medical Sciences
Faculty of Medicine
Department of Microbiology and Immunology
A thesis Submitted for "MSc" degree:

Subject:

Frequency of *bla*_{NDM-1}, *bla*_{IMP}, *bla*_{AIM} Metallo betalactamases genes in clinical
Isolates of Carbapenem Resistant *Escherichia coli* isolated from Intensive Care
Units of Hospitals of Qazvin, Tehran and Karaj

Thesis Advisor:

Dr. Masoumeh Aslanimehr (Ph. D)

Dr. Amir Peymani (Ph.D)

Dr. Ameneh Barikani (Ph. D)

By: Keyvan Esmaili farde barzegar

September 2016